

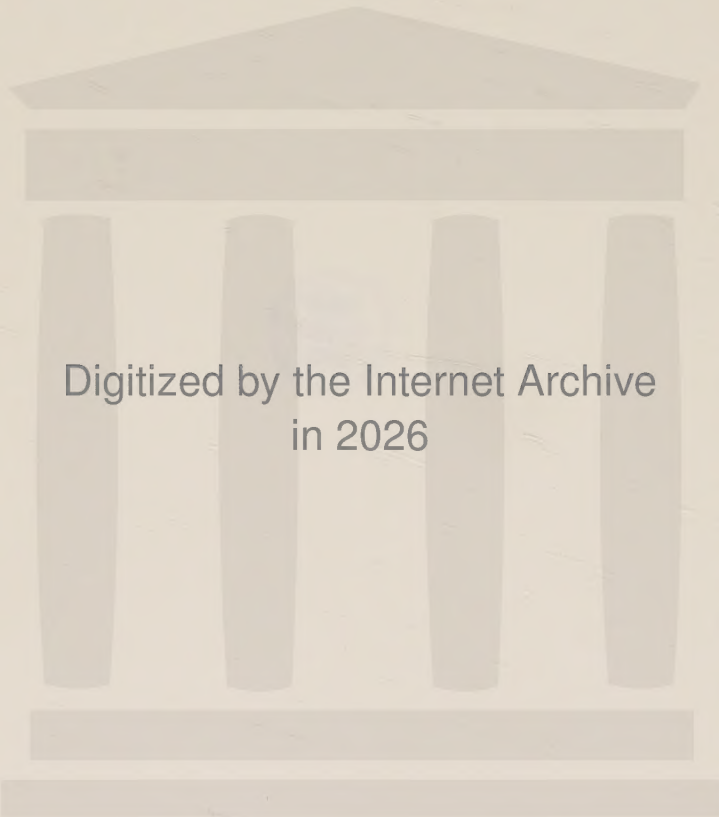
**ZUM VORKOMMEN UND NACHWEIS
VON LISTERIEN IN KÄSEREIEN**

URSULA HARTMANN

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0033

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

und der

Milchwirtschaftlichen Untersuchungs- und
Versuchsanstalt Kempten (Allgäu)
(Direktor: F. Beyer)

Zum Vorkommen und Nachweis von Listerien in Käsereien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ursula Hartmann
aus
Oberreute

Kempten 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. G. Terplan

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr.habil. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1 Taxonomie	2
2.2 Eigenschaften der Listerien	3
2.2.1 Morphologie und biochemische Eigenschaften	3
2.2.2 Ökologie und Tenazität	7
2.3 Vorkommen von Listerien	11
2.3.1 Listerien in der Umwelt	11
2.3.2 Listerien in Lebensmitteln	13
2.3.3 Vorkommen und Kontaminationsquellen von Listerien in Käsereien	15
2.4 Methoden und Medien zum Nachweis von Listerien	22
2.4.1 Anreicherungs- und Isolierungsmedien	22
2.4.2 Nachweisverfahren	25
3. Eigene Untersuchungen	29
3.1 Umgebungsuntersuchungen in Betrieben	29
3.1.1 Material	29
3.1.1.1 Probenmaterial	29
3.1.1.2 Nährmedien und Reagenzien zum Nachweis von Listerien	30
3.1.2 Methodik des Listeriennachweises	34
3.1.3 Ergebnisse	38
3.1.3.1 Nachweis von Listerien in Käsereien	38
3.1.3.2 Nachweis von Listerien in Stuhlproben	46
3.2 Modellversuche zur Keimdynamik von Listerien	48
3.2.1 Listerienvermehrung in Schnittkäse	48
3.2.1.1 Material	48
3.2.1.2 Methodik	48
3.2.1.3 Ergebnisse des Käsereiversuches	51

3.2.2	Einfluß von Mycoderma-Hefen auf die Listerien- vermehrung	54
3.2.2.1	Material	54
3.2.2.2	Methodik	54
3.2.2.3	Ergebnisse	56
3.2.3	Versuche zur oberflächlichen Kontamination von Fetakäse	58
3.2.3.1	Material	58
3.2.3.2	Methodik	58
3.2.3.3	Ergebnisse	59
3.2.4	Versuche zur Kochsalztoleranz von Listerien	60
3.2.4.1	Material	60
3.2.4.2	Methodik	60
3.2.4.3	Ergebnisse	61
3.3	Vergleich mehrerer Nachweismedien für Listerien	62
3.3.1	Material	62
3.3.1.1	Zum Listeriennachweis verwendete Nährmedien und Reagenzien	62
3.3.1.2	Probenmaterial	65
3.3.2	Methodik	65
3.3.2.1	Vergleich von selektiven Listeria-Anreiche- rungsmedien	65
3.3.2.2	Listeriennachweis in einem künstlich kontami- niertem Rotschmierekäse	65
3.3.2.3	Listeriennachweis durch Einsatz verschiedener Isolierungsnährmedien	66
3.3.3	Ergebnisse	67
3.3.3.1	Vergleich von Listeria-Nachweisverfahren	67
3.3.3.2	Vergleich unterschiedlicher Isolierungsnähr- böden	68
4.	Diskussion	75
5.	Zusammenfassung	91
6.	Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

Nach einem Listeriose-Ausbruch im ersten Halbjahr 1985 in Kalifornien, bei dem 142 Menschen durch den Verzehr eines listerienhaltigen Labkäses an Listeriose erkrankten, wovon 33% an den Folgen der Erkrankung starben, wurden durch die Food and Drug Administration (FDA) in den Vereinigten Staaten umfangreiche Untersuchungen in inländischen Betrieben und an importierten Käsen durchgeführt. In 2,5% der Betriebe und in mehreren importierten Käsesorten konnte *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden.

Dies hatte erhebliche Rückwirkungen auf die Käseindustrie der exportierenden Länder. Da man mit einem völlig neuen Problem konfrontiert wurde, wußte man wenig über die Herkunft der Keime. Allerdings merkte man bald, daß es sich in den meisten Fällen um eine Kontamination der Produkte nach der Pasteurisierung handelte.

Da bisher wenig über ökologische Nischen und Kontaminationsquellen in Käsereien, aus denen die listerienhaltigen Käse stammten, bekannt war, wurden in eigenen Untersuchungen Umfeld- und Stufenkontrollen in Käsereien durchgeführt. In Modellversuchen wurden die Tenazität gegenüber Kochsalz geprüft und Keimdynamikstudien an künstlich kontaminierten Käsen vorgenommen.

Weiterhin wurde geprüft, ob die Nachweismedien, die sich als unbefriedigend erwiesen hatten, verbesserungsfähig sind, insbesondere ob durch ein Moxalactam enthaltendes Isolierungsmedium die Listerien besser erfaßt werden können.

2. Schrifttum

2.1 Taxonomie

Die Gattung *Listeria* wird in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 (1986) als Genus in der Gruppe "regulärer, nicht sporenbildender, grampositiver Stäbchen" geführt. Das Genus *Listeria* umfaßt dabei die Spezies *Listeria* (L.) *monocytogenes* (MURRAY, 1926), *L. innocua* (SEELIGER, 1981), *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984), *L. seeligeri* (ROCOURT und GRIMONT, 1983), *L. welshimeri* (ROCOURT und GRIMONT, 1983), *L. murrayi* (WELSHIMER und MEREDITH, 1971), *L. grayi* (LARSEN und SEELIGER, 1966) und *L. denitrificans*.

L. monocytogenes galt lange als einheitliche Spezies, die aufgrund unterschiedlicher Oberflächenstrukturen in verschiedene Serovare unterteilt wurde (PATERSON, 1940). Anhand neuerer Forschungsergebnisse wurden genetische und biochemische Unterschiede der verschiedenen Serovare von *L. monocytogenes* aufgezeigt (SEELIGER, 1961; GRAY und KILLINGER, 1966; DONKERVOET, 1972; STUART und WELSHIMER, 1973; SEELIGER et al., 1982; ROCOURT und GRIMONT, 1983; ROCOURT et al. 1983; SEELIGER et al., 1984). Dies führte schließlich zur Unterteilung der Gattung *Listeria* in acht Spezies, wobei *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. seeligeri* aufgrund serologischer Verwandtschaft untereinander als *L. monocytogenes sensu lato* (ROCOURT et al., 1982) und *L. grayi*, *L. murrayi*, und *L. denitrificans* als "Spezies Incertae Sedis" bezeichnet wurden (SEELIGER und JONES, 1986). *L. denitrificans* wurde inzwischen aus der Gattung *Listeria* ausgeschlossen und einem neuen Genus *Jonesia* als *Jonesia denitrificans* zugeordnet (ROCOURT, 1988). Die Zugehörigkeit der serologisch miteinander verwandten Spezies *L. grayi* und *L. murrayi* zum Genus *Listeria* war aufgrund serologischer Unterschiede zu den anderen *Listeria*-Spezies ebenfalls lange umstritten. STUART und WELSHIMER (1973) forderten, *L. grayi* und *L. murrayi* aus dem

Genus *Listeria* herauszunehmen und einem neuen Genus *Murrayia* als *Murrayia grayi* subspecies *grayi* und *Murrayia grayi* subspecies *murrayi* zuzuordnen. Aufgrund neuerer Untersuchungen von ROCOURT et al. (1987), die durch die Ergebnisse der 16S rRNS-Katalogisierung eine Verwandtschaft zwischen *L. monocytogenes* und *L. murrayi* beweisen konnten, bleiben *L. murrayi* und *L. grayi* weiterhin dem Genus *Listeria* zugeordnet.

2.2 Eigenschaften der Listerien

2.2.1 Morphologie und biochemische Eigenschaften

In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology haben SEELIGER und JONES (1986) die wesentlichen Eigenschaften der Listerien beschrieben:

Listerien sind kurze, an den Enden abgerundete, grampositive Stäbchen mit einer Länge von 0,5 bis 2,0 μm und einem Durchmesser von 0,4 bis 0,5 μm , die gekrümmt sein können. Sie liegen einzeln oder in kurzen Ketten, palisadenartig geschichtet oder V- bzw. Y-förmig aneinandergeordnet. In älteren Kulturen oder in der Rauhform können Fäden bis zu 20 μm Länge und zunehmender Gramlabilität vorkommen. Durch zwei bis drei peritrich angeordnete Geißeln sind Listerien beweglich. Die Ausbildung der Geißeln nimmt mit zunehmender Temperatur ab, so daß Listerien ihr Bewegungsoptimum bei 20 bis 25°C haben, bei 37°C sind sie praktisch unbeweglich. Die im Nativpräparat feststellbare, rotierende und taumelnde Beweglichkeit kann durch Stichbeimpfung in einen entsprechenden Nähragar sichtbar gemacht werden. Kulturell sind die Keime äußerst anspruchslos. Sie wachsen aerob und fakultativ anaerob auf allen gebräuchlichen Nährböden, wobei Kohlenhydrate essentiell sind. Optimale Wachstumsbedingungen haben sie zwischen 30 und 37°C im neutralen bis leicht alkalischen Milieu. Ihre Fähigkeit, sich noch bei 4°C zu vermehren, wird bei der sogenannten "Kälteanreicherung" (GRAY et al., 1948) ausgenutzt.

Die kleinen, runden Kolonien erscheinen auf festen Medien blau-grau bei normalem Licht und charakteristisch blau-grün mit feiner Textur bei der Schräglichtdurchleuchtung nach HENRY (1933) (GRAY, 1957; SEELIGER und JONES, 1986). Auf Blutagar wachsen Listerien innerhalb von 24 bis 48 h als kleine, glänzende, glattrandige Kolonien von weißlicher Farbe. Einige Spezies (*L. ivanovii*, *L. monocytogenes* und *L. seeligeri*) produzieren eine β -Hämolysen in Anwesenheit von Erythrozyten vom Schaf, Rind, Pferd oder Menschen. Eine Verstärkung der Hämolysenaktivität von *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* kann durch den CAMP-Test (CHRISTIE et al., 1944) erreicht werden (GROVES und WELSHIMER, 1977). *L. ivanovii* zeigt ein ähnliches Phänomen wie im CAMP-Test mit *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, wenn die fragliche Kolonie auf Blutagar im rechten Winkel zu einem *Rhodococcus* (*R.*) *equi*-Stamm ausgestrichen wird (HUNTER, 1973; ROCOURT et al., 1983).

Alle *Listeria*-Arten sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ, zeigen positive Methylrot- und Voges-Proskauer-Reaktion und fermentieren Glucose, Äsculin und Maltose, ohne Gas zu bilden. Die wichtigsten Eigenschaften der Listerien, die zur Unterscheidung von anderen ihnen ähnlichen Gattungen herangezogen werden, sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Zusammenfassung wichtiger Charakteristika der Gattung *Listeria* (in Anlehnung an SEELIGER und JONES, 1986)

Untersuchungskriterium	Reaktion
Beweglichkeit bei 37°C	-
Beweglichkeit bei 20 bis 25°C	+
Sauerstoffbedarf	fakultativ
Katalaseaktivität	+
Methylrot-Reaktion	+
Voges-Proskauer-Reaktion	+
Citrat-Vergärung	-
Indol-Produktion	-
Urease-Aktivität	-
Spaltung von Glucose	+
Spaltung von Äsculin	+
Spaltung von Maltose	+
Schwefelwasserstoff-Produktion	-

In Tab. 2 sind die biochemischen Reaktionen zusammengefaßt, anhand derer eine Unterscheidung zwischen den *Listeria*-Spezies möglich ist.



Tabelle 2: Wichtige Parameter zur Differenzierung der verschiedenen *Listeria*-Spezies (in Ahnlehnung an SEELIGER und JONES, 1986)

Listeria-Spezies ¹	β-Hämolyse		Nitrat		Fermentierung von		
	Stich	CAMP-Test S.a. ² R.e. ³			Xylose	Rham- nose	Manni- tol
L.m.	+	+	-	-	-	+	-
L.iv.	+	-	+	-	+	-	-
L.i.	-	-	-	-	-	-/+	-
L.w.	-	-	-	-	+	-/+	-
L.s.	+	+	-	-	+	-	-
L.g.	-	-	-	-	-	-	+
L.mu.	-	-	-	+	-	-/+	+

Zeichenerklärungen:

¹ L.m. = *L. monocytogenes*; L.iv. = *L. ivanovii*; L.i. = *L. innocua*; L.w. = *L. welshimeri*; L.s. = *L. seeligeri*; L.g. = *L. grayi*; L.mu. = *L. murrayi*;

² S.a. = *S. aureus*;

³ R.e. = *R. equi*.

Als pathogen für den Menschen gilt *L. monocytogenes*, während *L. ivanovii* nach heutigem Kenntnisstand nur bei Tieren, besonders Schafen, als krankheitserregend nachgewiesen wurde. Die anderen Arten gelten als nicht pathogen (HOF et al., 1986, STEINMEYER, 1988).

2.2.2 Ökologie und Tenazität

Listerien sind anspruchslose Keime, die gegenüber Umwelteinflüssen wie Temperatur, pH-Schwankungen, erhöhten Kochsalzkonzentrationen, Austrocknung und Sonneneinstrahlung äußerst resistent sind.

Temperatur:

Optimale Wachstumsbedingungen haben sie bei 30 bis 37°C in neutralem bis leicht alkalischem Milieu, vermehren sich jedoch im Temperaturbereich von 1 bis 45°C (SEELIGER und JONES, 1986) und können wesentlich höhere oder niedrigere Temperaturen noch überleben. Die Erforschung ihrer Hitzeresistenz ist seit langem Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Kurzzeiterhitzung (71°C, 15 s) reicht unter normalen Umständen aus, Listerien in der Rohmilch abzutöten (WHO, 1988). STEINMEYER (1988) gibt einen genauen Überblick über die bisherigen Erkenntnisse zur Hitzeresistenz von Listerien, so daß hier nicht weiter darauf eingegangen werden soll.

SEELIGER (1958) zeigte, daß die Einwirkung tiefer Temperaturen (-20 bis -75°C) keinen schädigenden Einfluß auf Listerien hat, sofern der Gefriervorgang schnell erfolgt und langsames Auftauen verhindert wird. RHOADES (1970) wies nach, daß lyophilisierte Listerienkulturen 20 Jahre lang lebensfähig sein können. LEHNERT (1960) zeigte, daß aus tiefgekühlten Erdproben, die während einer längeren Lagerung bis zu 35 mal aufgetaut und wieder eingefroren wurden, noch nach zwei Jahren Listerien isoliert werden können. In künstlich kontaminiertem Fleisch, das bei -10°C gelagert und ebenfalls mehrmals aufgetaut wurde, konnten noch nach 18 Monaten Listerien nachgewiesen werden (SIELAFF, 1966). In Hirngewebesuspensionen waren Listerien bis zu 16 Jahre, in Milch bis zu 13 Jahre und in Silage und Rinderkot maximal 12 Jahre lebensfähig, wobei alle Proben bei 5°C gelagert wurden (DIJKSTRA, 1975).

Mit sinkender Temperatur ist allerdings eine Verlängerung der Lag-Phase und eine Zunahme der Generationszeiten zu beobachten (WILKINS et al., 1972). ROSENOW und MARTH (1987) untersuchten die Wachstumsrate mehrerer *L. monocytogenes*-Stämme in Milch und Milcherzeugnissen. Sie beobachteten, daß die Wachstumsrate, unabhängig vom Medium, mit steigender Temperatur zunahm. Die Verdoppelungszeiten der einzelnen Stämme betrugen bei 35°C 41 min, bei 21°C bis zu 1 h 55 min und bei 4°C bis zu 45 h 33 min. DONNELLY und BRIGGS (1986) dagegen stellten neben der Temperaturabhängigkeit auch einen Einfluß des Mediums (Vollmilch, fettarme Milch, Magermilch) auf die Vermehrungsrate fest, wobei in Vollmilch die größten Keimzahlen erreicht wurden.

Einfluß niedriger pH-Werte:

Nach SEELIGER und JONES (1986) vermehren sich *Listerien* im pH-Bereich von 6,0 bis 9,0. GRAY und KIILINGER (1966) stellten fest, daß *L. monocytogenes* bei pH-Werten unter 5,6 normalerweise abgetötet wird. CONNER et al. (1986) dagegen konnten die Überlebensfähigkeit in Krautsaft bei pH 4,1 nachweisen und fanden pH 5,0 als kritischen Wert für die Vermehrungsfähigkeit. GEORGE et al. (1988) zeigten darüber hinaus, daß sich die Keime im Temperaturbereich von 20 bis 30°C auch noch bei pH 4,39 vermehren können. Die Vermehrungsfähigkeit von *L. monocytogenes* bei niedrigen pH-Werten in Abhängigkeit von der Temperatur wurde von mehreren Autoren untersucht (Tab. 3). GEORGE et al. (1988) zeigten dabei, daß mit sinkender Temperatur die pH-Toleranz abnimmt.

Tabelle 3: Vermehrungsfähigkeit von *L. monocytogenes* bei niedrigen pH-Werten (z.T. in Abhängigkeit von der Temperatur)

Temperatur (°C)	pH	Medium	Autoren
5	5,0	Krautsaft	CONNER et al. (1986)
3	5,2-5,4	Cottage Cheese	RYSER et al. (1985)
15-16	5,5	Camembert	RYSER und MARTH (1987b)
20-30	4,4	TSB ¹	GEORGE et al.
7-10	4,6		(1988)
4	5,2		
4	>5,6	Fleischwaren	HOPPER (1988)

¹ TSB = Trypticase Soy Broth.

Kochsalz:

Auch gegenüber erhöhten NaCl-Konzentrationen zeigen sich *Listerien* sehr widerstandsfähig. SIELAFF (1966) gelang es, in reines Kochsalz geimpfte *Listerien* noch nach 150 Tagen nachzuweisen. Aus einer flüssigen Kultur, der 22% Kochsalz zugesetzt waren, konnte er sie 46 Tage lang isolieren. In kontaminiertem Rindfleisch, das bei 15 bis 20°C in 22%iger Nitritpökelsalzlösung in Steinbottichen gepökelt wurde, konnte er noch nach 100 Tagen *Listerien* nachweisen.

POMANSKAJA (1961) zeigte, daß Listerien in physiologischer Kochsalzlösung bei 20°C 545 Tage überleben. SEELIGER (1961) wies sie in 16%iger NaCl-Lösung und pH 6,0 über ein Jahr lang nach. STENBERG et al. (1961) stellten fest, daß Listerien in 1%iger Dextrosebouillon mit 6% NaCl über ein Jahr mit 12% NaCl bis zu 64 Tagen und mit 24% NaCl noch 22 Tage überleben können. Untersuchungen von SHAHAMAT et al. (1980) zeigten, daß die Widerstandsfähigkeit gegenüber höheren NaCl-Konzentrationen mit steigender Temperatur abnimmt (Tab. 4).

Tabelle 4: Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* in hohen Salzkonzentrationen in Abhängigkeit von der Temperatur (SHAHAMAT et al., 1980)

Temperatur	Überlebensdauer (d) in Trypticase soy broth mit NaCl (%)				
(°C)	10,5	13,5	15,5	20,5	30,5
37	14	10	5	5	5
22	- ¹	36	29	28	24
4	>132	>132	>132	>132	>132

¹ keine Hemmung durch 10,5% NaCl-Zusatz feststellbar.

CONNER et al. (1986) hingegen kamen zu dem Ergebnis, daß ein Kochsalzzusatz von 1% das Listerienwachstum in Krautsaft fördert, während mehr als 2% sich hemmend auswirken.

Sonneneinstrahlung und Austrocknung:

Auch gegenüber Sonneneinstrahlung und Austrocknung erwiesen sich Listerien als resistent. Auf kontaminierten Weiden konnten die Erreger über Monate nachgewiesen werden (BIESTER und SCHWARTE, 1939), und in Erdproben von der Oberfläche, die dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt war, überlebte *L. monocytogenes* bis zu 12 Tage (SLIVKO, 1965). LEHNERT (1960) zeigte, daß an Stroh angetrocknete Listerien 207 Tage, in luftgetrockneter Ackererde und in trockenem Kot über zwei Jahre lebensfähig sind. Gegenüber kurzwelligem UV-Licht ist *L. monocytogenes* empfindlich, nicht jedoch gegenüber langwelligem UV-Licht. In getrocknetem Zustand ist die UV-Resistenz deutlich verstärkt (HOPPER, 1988).

2.3 Vorkommen von Listerien

2.3.1 Listerien in der Umwelt

Bis vor wenigen Jahren wurde die Listeriose des Menschen als reine Zooanthroponose angesehen, wobei der Kontakt mit Tieren und der Genuß von Lebensmitteln tierischer Herkunft als Ansteckungsquellen für den Menschen galten (AMTSBERG, 1980). Zahlreiche Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien in der Außenwelt (Tab. 5) zeigten jedoch, daß es sich um ubiquitär vorkommende Keime handelt, die als Saprophyten in der Umgebung von Mensch und Tier leben können (WEIS und SEELIGER, 1975; ORTEL, 1975; SKOVGAARD, 1987).

Tabelle 5: Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien in der Umwelt

Listerienhaltiges Material	Autoren
Silage	OLAFSON (1940), GRAY (1960)
Erd- und Pflanzenproben	WELSHIMER und DON- KER-VOET (1971)
Erde, Gras, Blätter, Wildfutter, Kot von Wildtieren, Schlammproben, Wildvögel	WEIS und SEELIGER (1975)
Silage, Gras	GRØNSTØL (1980)
Flußwasser, Abwasser, Klärschlamm	WATKINS und SLEATH (1981)
Ungeklärte und biologisch gerei- nigte Abwässer	GEUENICH und MÜLLER (1984)
Kot von Wildvögeln, Abwasser an Vogelfutterplätzen, Silage	FENLON (1985)
Rinderfaeces, Stroh, Silage	SKOVGAARD und MORGEN (1988)

2.3.2 Listerien in Lebensmitteln

Aufgrund mehrerer Listeriose-Ausbrüche der letzten Jahre, die auf den Genuß verschiedener listerienhaltiger Lebensmittel zurückgeführt werden konnten (Tab. 6), wurden umfangreiche Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien in Lebensmitteln durchgeführt.

Tabelle 6: Lebensmittelbedingte Listeriose-Ausbrüche in den Jahren 1979 bis 1987

Zeit	Ort	Infektions- quelle	erkrank- te Per- sonen	Todes- fälle (%)	Autor
1979	Boston/ USA	Roher Sellerie, Tomaten, Salat	20	20?	HO et al. (1986)
1981	Nova Sco- tia/Kanada	Krautsalat	41	44	SCHLECH et al. (1983)
1983	Massachu- setts/USA	pasteurisierte Milch ¹	49	29	FLEMING et al. (1985)
1985	Los Ange- les/USA	Labkäse "Mexi- kanische Art"	142	33	HIRD (1987)
1983 bis 1987	Kanton Waadt/ Schweiz	Rotschmiere- käse	122	27	BILLE und GLAUSER (1988)

¹ Die krankheitsverursachenden Serovare konnten weder in der pasteurisierten Milch noch in der entsprechenden Rohmilch nachgewiesen werden. Der Kausalzusammenhang wurde epidemio-
logisch begründet und ist sehr umstritten.

Seit durch Verzehr von Weichkäse Listerioseerkrankungen auftraten, wurde weltweit Käse, insbesondere Weichkäse mit Rotschmiereoberfläche, auf das Vorkommen von Listerien untersucht. Diese Untersuchungen ergaben im allgemeinen relativ geringe *L. monocytogenes*-Gehalte. Bei gezielten Untersuchungen von Rotschmierekäse, wurde jedoch in bis zu 10% der Proben *L. monocytogenes* gefunden (Literaturübersicht bei ERDLE, 1988; TERPLAN, 1988a). Mitteilungen über die Ergebnisse neuerer Untersuchungen bestätigen im wesentlichen diese Befunde. PINI und GILBERT (1988) fanden 10%, BREER (1988) 7%, BIND (1988) jedoch nur 1,5% der von ihnen untersuchten Weichkäsesorten als mit *L. monocytogenes* kontaminiert.

Bemerkenswert ist, daß kein nennenswerter Unterschied in der Häufigkeit von *L. monocytogenes* zwischen den aus Rohmilch und den aus pasteurisierter Milch hergestellten Weichkäsen festgestellt wurde (Literaturübersicht bei ERDLE, 1988; BIND, 1988).

Auch bei Untersuchungen von Rohmilch selbst wurde ein relativ seltenes Vorkommen von *L. monocytogenes* (0 bis 7%) festgestellt (GASPAROVIC, 1988; TERPLAN, 1988a).

Untersuchungen von anderen Lebensmitteln zeigten schon seit Jahren, daß Fleisch und Fleischwaren erheblich stärker kontaminiert sind als Milch und Milchprodukte (Literaturübersicht bei ERDLE, 1988). Neuere Untersuchungen bestätigen diese Befunde. So fanden SKOVGAARD und MORGEN (1988) bei Rinderhackfleisch in 28% der Proben *L. monocytogenes*. In gemischtem Hackfleisch haben BREER (1988) in 16% und BREUER und PRÄNDL (1988) in 36% der Proben *L. monocytogenes* nachgewiesen. Dabei war der Anteil bezogen auf alle *Listeria*-Spezies sogar 65%. Bei Mettwurst wurde in 12% (ERDLE, 1988) bzw. in 23% der Proben (BREUER und PRÄNDL, 1988) *L. monocytogenes* gefunden. Bei Geflügelfleischuntersuchungen fanden WEISE (1987) in 85%, SKOVGAARD und MORGEN (1988) in 47% und PINI und GILBERT (1988) in 60% der Proben *L. monocytogenes*.

Bei in den USA durchgeführten Untersuchungen an Krabbenfleisch und anderen Fischprodukten erwiesen sich 4 bis 8% als *L. monocytogenes* positiv (ARCHER, 1988).

In Gemüsen und Salaten konnten ebenfalls Listerien nachgewiesen werden. Die gehäuft auftretenden Listeriosefälle in Kanada (1981) konnten auf den Verzehr von *L. monocytogenes*haltigem Krautsalat zurückgeführt werden (SCHLECH et al., 1983). BREER (1988) wies in drei von 91 Proben verschiedener Gemüse- und Salatsorten *L. monocytogenes* nach. TERPLAN (1988c) berichtet von Listerienfunden in vorzerkleinerten Salaten, tiefgekühlten Fertiggerichten und Torten.

Im Rahmen des "Dairy Product Safety Program" der Food and Drug Administration (FDA) konnte aus 4% verschiedener Eiskremsorten *L. monocytogenes* isoliert werden (ARCHER, 1988).

2.3.3 Vorkommen und Kontaminationsquellen von Listerien in Käsereien

Aus den bisherigen Ausführungen wird ersichtlich, daß sich Listerien in vielen Lebensmitteln halten können. Die Übertragung kann bereits mit dem Rohstoff (Milch, Fleisch oder Gemüse) erfolgen. Die wichtigsten Kontaminationsquellen, die zu einer Übertragung von Listerien bei der Herstellung von Lebensmitteln führen können, sind in den Abb. 1 und 2 (TERPLAN, 1988b) dargestellt.

In Abb. 1 sind Einschleppungsmöglichkeiten aus dem Außenbereich aufgezeigt, wie sie insbesondere auf lebensmittelherstellende Betriebe mit ländlichem Standort zutreffen. Wie die Untersuchungen von SKOVGAARD und MORGEN (1988) zeigen, weisen Kuhkot und Silage einen hohen Kontaminationsgrad mit *L. monocytogenes* (52% bzw. 65%) auf, wobei der Mensch als Vektor (Schuhe, Kleidung) die Keime in den Betrieb einschleppen kann. In Abb. 2 ist der Mensch ein direktes Glied des Kontaminationskreislaufes, durch dessen Ausscheidungen der Kreislauf auch initiiert werden kann.

Abb.1: Landwirtschaftlicher Zyklus von Listerien mit Übertragungsmöglichkeit auf Lebensmittel (TERPLAN , 1988 b) .

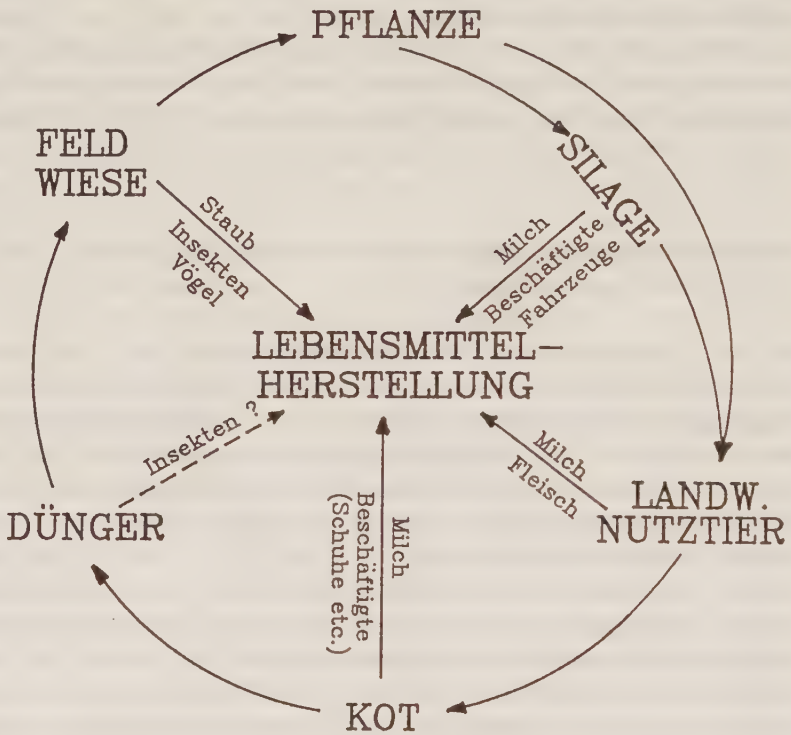
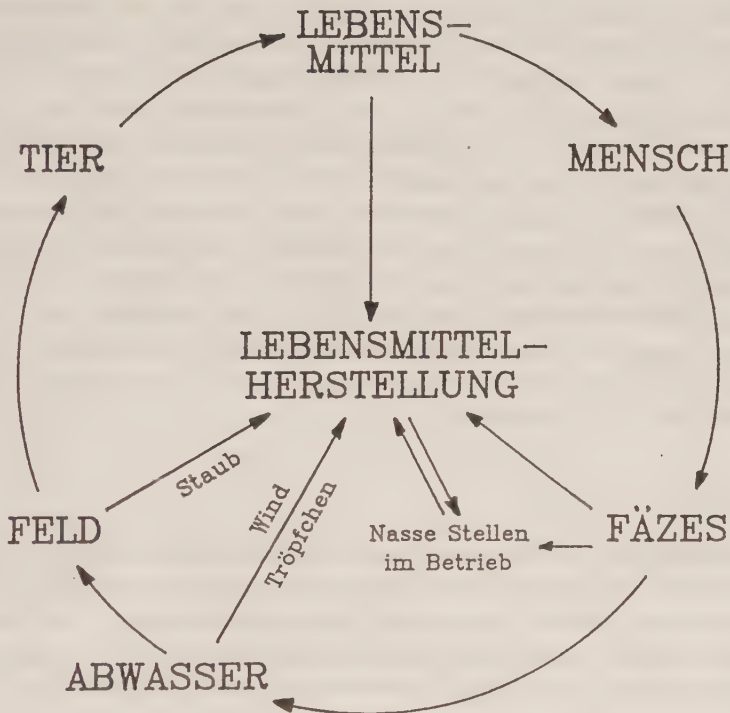


Abb. 2: Humaner Zyklus von Listerien mit Übertragungsmöglichkeit auf Lebensmittel (TERPLAN, 1988 b).



Die Ergebnisse von Stuhluntersuchungen klinisch gesunder Personen weisen auf die Bedeutung dieser Eintrittspforte hin (Tab. 7). Dabei zeigte sich, daß bei ein- bis zweimalig erfolgter Stuhluntersuchung etwa 10% der Personen *L. monocytogenes* im Stuhl ausschieden. KAMPELMACHER et al. (1972 und 1976) untersuchten Stuhlproben von Schwangeren über einen längeren Zeitraum und stellten fest, daß bei einer großen Anzahl der Personen *L. monocytogenes* im Stuhl nachweisbar war. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß die Ausscheidung nicht immer kontinuierlich erfolgte. In einem Fall konnte auch nach erfolgter Ampicillin-Therapie *L. monocytogenes* im Stuhl isoliert werden (KAMPELMACHER und VAN NOORLEJANSEN, 1972). Auch ORTEL (1975) beobachtete, daß die Ausscheidung von *L. monocytogenes* nicht permanent erfolgt, und daß ein Wechsel der Serovarietäten stattfinden kann. Anhand der ausgewählten Personenkreise wird deutlich, daß die Herkunft der Probanden (Landwirtschaft; Schlachthofarbeiter; Labor, in welchem mit *Listerien* gearbeitet wurde) nicht unbedingt das entscheidende Kriterium für den Nachweis von *L. monocytogenes* im Stuhl ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird die Wichtigkeit der Personalhygiene im lebensmittelherstellenden Betrieb unterstrichen.

International und national haben sich Expertengremien und Verbände mit dem Problem der Umgebungskontaminationen in lebensmittelherstellenden Betrieben auseinandergesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit werden hauptsächlich Empfehlungen und Maßnahmen zur Sanierung im Bereich der Weichkäse produzierenden Betriebe betrachtet.

Tabelle 7: Untersuchungen verschiedener Autoren zum Nachweis von
L. monocytogenes sensu lato in Stuhlproben klinisch
gesunder Personen

Untersuch- ter Perso- nenkreis	Anzahl der Personen		Anzahl der Stuhlproben		Autoren
	gesamt	positiv (%)	gesamt	positiv (%)	
Fabrikarbeiter	86	25(29)	86	25(29)	KAMPELMACHER und VAN NOORLE- JANSEN (1969)
Fabrikarbeiter	66	7(11)	66	7(11)	
Schlachthof- arbeiter	98	13(13)	98	13(13)	
Büroangestellte	92	11(12)	92	11(12)	
Hebammen	40	4(10)	40	4(10)	ORTEL (1971)
Schwangere	137	60(44)	1114	118(11)	KAMPELMACHER et al. (1972)
Labor- bzw.	26	20(77)	208	43(21)	KAMPELMACHER und VAN NOORLE- JANSEN (1972)
Büroangestellte	26	16(62)	208	25(12)	
Arbeiter im Lebensmittel- und Gaststät- tengewerbe	318	15 (5)	318	15 (5)	BERGER und PIETSCH (1975)
Schwangere:					
Bäuerinnen,	22	7(32)	142	13 (9)	KAMPELMACHER et al. (1976)
Frauen mit Kleintieren,	92	36(39)	600	60(10)	
Frauen ohne Kleintiere	93	32(34)	595	43 (7)	
Hebammen, Schwangere, Schlachthof- arbeiter, La- borangestellte, u.a.	841	82(10)	1822	113 (6)	ORTEL (1975)

Ein Expertengremium der World Health Organisation (WHO) hat wichtige Parameter für die Milchindustrie zusammengestellt (WHO, 1987). Darin wird verlangt, daß pathogene Keime und verderbniserregende Mikroorganismen bei Lebensmittelherstellung, -lagerung und -vertrieb unter allen Umständen zu vermeiden sind. Bei der Herstellung sollte versucht werden, dieses Ziel durch GMP (Good Manufacturing Practice) zu erreichen. Dazu ist es notwendig, daß der Hersteller die pathogenen bzw. schädlichen Mikroorganismen, sowie deren Ökologie und Einfluß auf das Lebensmittel kennt. Da im Falle von Weichkäse die Produktions- und Reifungsbedingungen (hohe Luftfeuchtigkeit, Wärme, pH) nur vorübergehend wachstumshemmend für Listerien sind (Wachstumshemmung von Listerien im Käsebruch), muß versucht werden, die Produktkontamination zu verhindern, insbesondere durch Kontrolle der Umgebung. Dazu ist es notwendig, die kritischen Punkte, an denen es zu einem Kontakt zwischen Listerien und Produkt kommen könnte, und ökologische Nischen für Listerien als ständige Kontaminationsreservoirs herauszufinden und zu beseitigen. In diesem Sinne sind stehendes Wasser und Kondensatansammlungen unbedingt zu vermeiden. Die Durchführung geeigneter Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen muß überwacht werden.

Die FDA hat in Verbindung mit anderen Organisationen an die amerikanische Milchindustrie Richtlinien herausgegeben, in denen mögliche Gefahrenquellen aufgezeigt werden, die zur Kontamination bei der Herstellung von Milchprodukten führen können (U.S. FDA et al., 1987). Dabei wird die Wichtigkeit der ordnungsgemäßen Durchführung der Pasteurisierung hervorgehoben. Es wird auf mögliche Fehler der Produktionsanlagen an sich (z.B. unsaubere Schweißnähte, Kreuzverbindungen, Spritzschutzbleche) hingewiesen und auf Fehler, die durch mangelnde Wartung der Produktionsanlagen (z.B. poröse Dichtungen, Haarrisse) entstehen können. Die ordnungsgemäße Durchführung und Überwachung von Reinigung und Desinfektion wird eingehend diskutiert. Als Luftkeime aus der Betriebsumgebung oder durch Luftumwälzung aufgewirbelt, können sich Listerien auf dem Produkt oder an geeigneten Brutstätten, wie Wasseransammlun-

gen in Tropfwasserauffangwannen oder Gullys, niederlassen und vermehren. Aus diesem Grund sollten sich Gullys und Abflurinnen nie direkt unter Produktionsanlagen befinden und sollten auf keinen Fall mit Hochdruckreinigern gereinigt werden. Daneben werden noch andere ökologische Nischen, wie Holzgegenstände oder Reinigungsgeräte, insbesondere Lumpen, aufgezeigt. Es wird darauf verwiesen, daß Retour-Waren unter keinen Umständen in die Produktionsräume gelangen dürfen. Der Personenverkehr im Betrieb ist zu reglementieren, die Personalhygiene muß absoluten Vorrang haben und ebenfalls strengstens überwacht werden. Die regelmäßige Coliformen-Kontrolle während der Produktion wird als Index zur Überwachung der erfolgten mikrobiellen Rekontamination nach der Pasteurisierung empfohlen.

Verschiedene europäische nationale Verbände sind dem Beispiel der FDA gefolgt und haben ähnliche Richtlinien herausgegeben. Der Deutsche Raiffeisenverband (DRV), der Milchindustrieverband (MIV) und der Bundesverband der privaten Milchwirtschaft (BPM) (1987) haben eine gemeinsame Empfehlung für die Hersteller von Weichkäse und halbfestem Schnittkäse verfaßt. Darin wird den Betrieben empfohlen, als Vorsorgemaßnahme regelmäßige Untersuchungen von Produkten, gegebenenfalls der Schmierflüssigkeit und der Flüssigkeit aus den Gullys der Reifungsräume durchführen zu lassen (Statuskontrollen). Die allgemeinen vorbeugenden Empfehlungen und Maßnahmen entsprechen im wesentlichen den Richtlinien der FDA. In Ergänzung dazu wird darauf hingewiesen, daß auch Zusatzstoffe und Molkereihilfsstoffe auf ihren Listeriengehalt überprüft werden sollten. Von konkreten Maßnahmen aus einem Rotschmierebetrieb berichtete MAUTNER (1988), wobei regelmäßig Endprodukte, Salzbad, Molke, Kulturen, Kondensate und Abstriche von Gullys und Fußböden auf Listerienfreiheit geprüft werden.

Aufgrund der vielfältigen Vermehrungs- und Kontaminationsmöglichkeiten für Listerien in lebensmittelherstellenden Betrieben kam ein Expertengremium der WHO zu der Auffassung, daß es nicht praktikabel sei, die absolute Listerienfreiheit aller Lebensmittel zu verlangen (WHO, 1988). Es sollte jedoch alles

unternommen werden, um das Risiko einer Listerienübertragung durch Lebensmittel auf den Menschen zu minimieren.

In diesem Zusammenhang berichtete COX (1988) über die Priorität der Kontrolle des mikrobiellen Kontaminationsdruckes, der in lebensmittelherstellenden Betrieben von verschiedenen Seiten auf das Produkt einwirken kann. Um diese Gefahr klein zu halten, ist es erstrebenswert, den Bereich der Fertigung und Reifung von allen anderen abzuschirmen. Die Einhaltung und Überwachung strikter Hygienemaßnahmen, die Vermeidung von Kondensaten, stehendem Wasser und Nahrungsmittelrückständen jeglicher Art sind Voraussetzung zur Verhinderung der Bildung ökologischer Nischen, vor allem im Hinblick auf Listerien. Weiterhin werden kurzfristige, mittelfristige und langfristige Maßnahmen beschrieben, die im Falle eines positiven Befundes einzuleiten sind.

Das WHO-Gremium (1988) fordert dringend, die Entwicklung von einfacheren und schnelleren Methoden zum Nachweis von Listerien voranzutreiben, um den Lebensmittelherstellern die Überwachung ihrer Produkte und Umgebung im Herstellungsbereich zu ermöglichen.

2.4 Methoden und Medien zum Nachweis von Listerien

2.4.1 Anreicherungs- und Isolierungsmedien

Eine Vielzahl von Medien zum Nachweis von Listerien in Gewebeproben, Lebensmitteln und Umgebungsproben wurde seit der Entdeckung der Gattung durch MURRAY et al. (1926) beschrieben. Von besonderem wissenschaftlichem Interesse ist die Entwicklung geeigneter Methoden und Medien zum Nachweis geringer Listerienzahlen in einer Umgebung mit hohem Anteil anderer Mikroorganismen (z.B. Käse, Faeces, Erdproben). Mit der Kälteanreicherung bei 4°C (GRAY et al., 1948) wurde die psychrotrophe Lebensweise der Listerien ausgenutzt. Diese Methode ist allerdings sehr zeitraubend (Generationszeit bei 4°C: 1,5 d) und daher zur Untersuchung von Lebensmitteln nicht geeignet,

zumindest, wenn den positiven Ergebnissen möglichst rasch Maßnahmen folgen sollen. Im Laufe der Jahre wurden der Nährstoffbedarf und daraus resultierende Ansprüche an das Nährmedium genauer untersucht. Wichtige Wachstumsfaktoren sind Arginin, Histidin, Methionin und Tryptophan (GRAY und KILLINGER, 1966).

Seit vermehrt Lebensmittel untersucht werden, sind vielseitige Bestrebungen im Gange, durch Einsatz geeigneter Prinzipien in den Anreicherungs- und Isolierungsmedien die Vermehrung der Listerien durch Erhöhung der Bebrütungstemperatur zu fördern und das Wachstum der Begleitflora durch Zugabe spezifischer Substanzen zu unterdrücken. Als Selektivstoffe fanden Farbstoffe, Antibiotika und andere Chemikalien, wie Kaliumthiocyanat oder Cycloheximid Verwendung. Durch den kombinierten Einsatz solcher Stoffe in den Anreicherungs- und/oder Isolierungsmedien wird bei den verschiedenen Nachweisverfahren versucht, eine möglichst vollkommene Hemmung der Begleitflora zu erzielen.

Zur Unterdrückung der gramnegativen Begleitflora finden Nalidixinsäure, Kaliumthiocyanat oder antibiotisch wirksame Substanzen wie Ceftazidim, Polymyxin B, Colistin-Sulfat, Fosfomycin oder Moxalactam Verwendung. Ein Zusatz von Phenylethanol verhindert das Wachstum von Pseudomonaden.

Die Hemmung der grampositiven Begleitflora erfolgt durch Zugabe von Acridinfarbstoffen, Lithiumchlorid oder Antibiotika bzw. Chemotherapeutika (Moxalactam, Fosfomycin).

Zur Unterdrückung von Hefen und Schimmelpilzen dienen Cycloheximid, Fosfomycin oder Amphotericin B.

Anwendungsbeispiele von verschiedenen selektiven Nachweismethoden sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Selektive Anreicherungs- und Isolierungsmedien
zum Nachweis von Listerien

Art der Probe	Selektivstoffe ¹	Medium ²	Autoren
Stuhlproben, Erde, Gewebe	PEA, Glyanhy, LiCl, Cyclohex	A	BEARNS und GIRARD (1959)
Umgebungs- proben	Thio	A	LEHNERT (1964)
Stuhlproben	Thiogly	A	KAMPELMACHER und VAN NOORLE-JANSEN (1969)
Stuhlproben	Acrif	A	RALOVICH et al.(1971)
Kotproben	Nal, Acrif, Poly B	A + B	RODRIGUEZ et al. (1984)
Milch	Amph B, Nal, Acrif	B	DONNELLY und BAIGENT (1986)
Fleisch	Nal, Acrif; PEA, LiCl, Glyanhy, Mox	B; A	LEE und McCLAIN (1986)
Milch	Nal, Acrif PEA, Glyanhy, LiCl, Cyclohex	A + B	LOVETT et al. (1987)
Fleisch, Fleischwaren	Thio Nal, Acrif	A + B	BREUER und PRÄNDL (1988)
Käse, Ab- striche	Acrif, Cefta	A	BANNERMAN und BILLE (1988)
Käse	Trypa, Nal	A	NORTHOLT et al.(1988)
Käse	Nal, Acrif, PEA	A	VAN NETTEN et al(1988)
Lebensmittel, Umgebungs- bungsproben	LiCl, Cyclohex Col, Acrif, Cefo, Fosfo	A	CURTIS et al. (1988)
Lebensmittel, Abstriche	Nal, Acrif	B	FRASER und SPERBER (1988)

Zeichenerklärung für Abkürzungen:

- 1 PEA = Phenylethanol-Agar; Glyanhy = Glycinanhydrid; LiCl = Lithiumchlorid; Cyclohex = Cycloheximid; Thio = Thiocyanat; Thiogly = Thioglycollat; Acrif = Acriflavin; Nal = Nalidixinsäure; Poly B = Polymyxin B; Amph B = Amphotericin B; Ceft = Ceftazidim; Trypa = Trypaflavin; Mox = Moxalactam; Col = Colistin-Sulfat; Cefo = Cefotetan; Fosfo = Fosfomycin;
- 2 A = Agar; B = Bouillon.

2.4.2 Nachweisverfahren

Ausgelöst durch die lebensmittelbedingten Listeriose-Ausbrüche wurde in den letzten Jahren die Entwicklung geeigneter Nachweisverfahren vorangetrieben. Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich in den verwendeten Medien, den Selektivstoffen, den Anreicherungstemperaturen und/oder im Anreicherungsmodus, sowie in den Bestätigungstests.

WATKINS und SLEATH (1981) beschrieben zur Isolierung von Listerien aus Abwasser und Flußwasser eine zweistufige Anreicherung, wobei nach einer Kälteanreicherung bei 4°C ein kleines Volumen in ein Selektivmedium (Nährbouillon mit Kaliumthiocyanat und Nalidixinsäure) überimpft wurden (Unteranreicherung). Nach einer Bebrütung bei 37°C erfolgte der Ausstrich auf einen nicht selektiven Tryptose-Agar.

RODRIGUEZ et al. (1984) testeten ebenfalls verschiedene Kombinationen von Hauptanreicherung (Kälteanreicherung in nicht selektiver Nährbouillon) und Unteranreicherung in Nährbouillon mit unterschiedlichen Selektivzusätzen (Bebrütung bei 22°C). Zur Isolierung wurde ein Agar mit Zusatz von Nalidixinsäure, Acriflavin und Eisen-Ammonium-Citrat verwendet. Die Autoren empfahlen ein Anreicherungsmedium, welches als Hemm-

stoffe Nalidixinsäure, Polymyxin B und Acriflavin enthält, in Verbindung mit einem Trypaflavin-Nalidixinsäure-Serumagar. Als Inkubationstemperatur für die Isolierungsmedien empfohlen sie etwa 22°C, um unerwünschte Begleitflora zu hemmen.

DONNELLY und BAIGENT (1986) beschrieben ein Verfahren, *L. monocytogenes* mittels Flowcytometrie nachzuweisen. Als Anreicherungsmedium verwendeten sie eine Modifikation des von RODRIGUEZ et al. (1984) empfohlenen Mediums. Dieses Anreicherungsmedium wurde als *Listeria*-Enrichment-Broth (LEB) oder University of Vermont Medium (UVM) bekannt und wird auch in dem von McCLAIN und Lee (1987) für Fleisch und Fleischwaren entwickelten Nachweisverfahren des United States Departement of Agriculture Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) verwendet.

Die USDA-FSIS-Methode basiert auf einer zweistufigen, selektiven Anreicherung und einem Phenylethanol enthaltendem Isolierungsnährboden. Für die Hauptanreicherung wird das Anreicherungsmedium von DONNELLY und BAIGENT (1986) verwendet. Das Anreicherungsmedium der Unteranreicherung unterscheidet sich nur im Acriflavingehalt (15 bzw. 25 mg/l). 25 g Probenmaterial werden homogenisiert und entweder die gesamte oder nur 10 ml der Anreicherung 24 h bei 30°C inkubiert. Nach 24 h wird für die Unteranreicherung 0,1 ml entnommen und 1:10 in Anreicherungsmedium verdünnt und 24 h bei 30°C bebrütet. Aus der Unteranreicherung wird 1 ml in 0,5%-ige KOH-Lösung 1:10 verdünnt. KOH-Verdünnung und Unteranreicherung werden auf Lithiumchlorid-Phenylethanol-Moxalactam-Agar (LPMA) ausgestrichen und 20 h bei 30°C bebrütet. Bei Bewertung der gewachsenen Kolonien im Schräglicht nach HENRY (1933) erscheinen *Listerien* als weiße bis blau-weiße Kolonien unterschiedlicher Größe. Die Autoren verwendeten ein Mikroskop um eine möglichst frühzeitige Auswertung zu ermöglichen (McCLAIN und LEE, 1988).

Die von der FDA entwickelte Methode wird fast weltweit als Referenzmethode zum Nachweis von *Listerien* in Milch und Milch-

produkten angewandt (LOVETT et al., 1987). 25 g bzw. 25 ml Probenmaterial werden 1:10 in Anreicherungsmedium (EB) (supplementiert mit Hefeextrakt, Acriflavin, Nalidixinsäure und Cycloheximid) homogenisiert und bei 30°C bebrütet. Jeweils nach einem und nach sieben Tagen wird eine Öse unverdünnte und eine Öse in 0,5% KOH 1:10 verdünnte Anreicherung auf modifiziertem McBride-Agar (MMA) ausgestrichen und 48 h bei 35°C bebrütet. Die Bewertung der gewachsenen Kolonien erfolgt im Schräglicht nach HENRY (1933), wobei die Listeria-Kolonien durch ihre typische blau-graue Farbe von anderen unterschieden werden können.

HAO et al. (1987) benutzten verschiedene Nachweisarten, um *L. monocytogenes* aus kontaminiertem Kraut zu isolieren. Sie verglichen die Kälteanreicherung, die konventionelle einstufige selektive Anreicherung, eine zweistufige Anreicherung (Kälteanreicherung mit nachgeschalteter selektiver Anreicherung bei 30°C) und den direkten Ausstrich auf verschiedene Isolierungsmedien.

DOYLE und SCHOENI (1986 und 1987) entwickelten eine verkürzte Selektiv-Anreicherungs-methode (SEP) und verglichen diese mit der Kälteanreicherung und der FDA-Methode. Bei der SEP wurde das Probenmaterial in Anreicherungsmedium (Tryptosebouillon mit Zusatz von defibriertem Schafblut, Polymyxin B, Acriflavin und Nalidixinsäure) 24 h bei 37°C und mikroaerophilen Bedingungen (5% O₂; 10% CO₂; 85% N₂) bebrütet. Als Isolierungsnährboden diente der MMA.

BREUER und PRÄNDL (1988) untersuchten Hackfleisch und Mettwürste und verglichen dabei zwei Anreicherungsmedien, ein Kaliumthiocyanat enthaltendes Anreicherungsmedium (LAB) der Fa. Merck und die EB. Als Isolierungsmedium diente der acriflavinhaltige Nährboden der Fa. Merck. Der Vergleich ergab, daß abhängig von der Verdünnung des Probenmaterials und der Bebrütungstemperatur mit der LAB bei 37°C und 1:10 Verdünnung, mit der EB bei 30°C und 1:100 Verdünnung die besten Resultate erzielt wurden.

BANNERMAN und BILLE (1988) verglichen den MMA mit einem Acridin-Fluorimetry (ACA) enthaltenden Isolierungsmedium (ACA). Als Probenmaterial dienten Abstriche von Weichkäsen und von Arbeitsflächen sowie Nasenabstriche der Beschäftigten. Mit dem ACA konnten die Autoren 33% mehr Listerien isolieren. Außerdem führte dieser Agar schneller zu positiven Ergebnissen.

BUCHANAN et al. (1988) überprüften die Nachweisrate subletal geschädigter Keime in verschiedenen Nährmedien. Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, daß der Anreicherung in selektivem Medium eine mindestens 6 bis 9 h Anreicherung in nicht selektivem Medium vorangehen muß, um subletal geschädigte Keime nachweisen zu können.

Der Nachteil der bisher beschriebenen Methoden ist die lange Zeitdauer. Ziel weltweiter Forschungen ist daher die Entwicklung schnellerer Nachweisverfahren, um den Lebensmittelherstellern eine Produktkontrolle zu ermöglichen, bevor die Ware in den Handel gelangt. Eine wesentliche Verbesserung kann erwartet werden, sobald es gelingt, bereits in der Anreicherung Listerien zu erkennen.

Ein erster Schritt in diese Richtung stellt möglicherweise die von FRASER und SPERBER (1988) entwickelte Methode dar, die auf der LEB (nach DONNELLY und BAIGENT, 1986) basiert. Sie soll es ermöglichen, einen Großteil Listeria unverdächtigster Proben bereits bei der Unteranreicherung zu erkennen. Die Autoren nutzen dabei die Fähigkeit aller Listeria-Spezies, Äsculin zu hydrolysieren. Werden dem Medium der Unteranreicherung Äsculin und Eisen-Ammonium-Citrat zugegeben, so verbinden sich die Spaltprodukte mit den Eisenionen zu einem Komplex (Schwarzfärbung). Die Autoren geben an, keine falschnegativen Befunde erhalten zu haben.

Weitere Ansätze in dieser Hinsicht stellen die DNA-Hybridisierung (KLINGER et al., 1988) und der ELISA (MATTINGLY et al., 1988) dar.

3. Eigene Untersuchungen

Die eigenen Untersuchungen gliedern sich in drei Hauptabschnitte. Im ersten Teil wurden in Rotschmiere- und in Sauermilchkäsereien sowie in einem Schnittkäse herstellenden Betrieb Umgebungsuntersuchungen durchgeführt, um Hinweise über den Ursprung der gelegentlich in Käse vorkommenden Listerien zu erhalten. In den Produkten, der in die Untersuchungen einbezogenen Betriebe, waren in vorangehenden Untersuchungen teils Listerien nachgewiesen worden, teils waren sie negativ. Daran anschließend wurden Modellversuche zur Keimdynamik von Listerien in Käse während der Herstellung, Reifung und Lagerung vorgenommen und die Toleranz der Listerien gegenüber verschiedenen Kochsalzkonzentrationen getestet, insbesondere im Hinblick auf das Salzbad als wesentliche Produktionsstufe bei der Herstellung der meisten Käsesorten und der Reifung und Lagerung von Fetakäse in Salzlake. Im dritten Teil der Arbeit wurden verschiedene Nachweismethoden für Listerien verglichen und auf ihre Eignung in der Routine-Diagnostik geprüft.

3.1 Umgebungsuntersuchungen in Betrieben

3.1.1 Material

3.1.1.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial stammte aus sechs Rotschmiere- und zwei Sauermilchkäsereien sowie aus einem Schnittkäse herstellenden Betrieb. Zur Auffindung von Bereichen innerhalb eines Betriebes, von denen Kontaminationen mit Listerien ausgehen können, wurde zunächst eine Stufenkontrolle im Produktionsablauf vorgenommen. Bei den dazu entnommenen Proben handelte es sich in den Rotschmierekäsereien um Rohmilch, pasteurisierte Milch, Bruch-Molke-Gemische, Salzbad, Schmierflüssigkeit, Käse nach dem Schmieren, Säureweckerkulturen, gebrauchsfertige Lablö-

sung und Endprodukte (Limburger-, Romadur-, Wein- bzw. Münsterkäse). In den Sauermilchkäsereien umfaßten die Stufenkontrollen Proben aus der Quarkmischwanne, Käse nach dem Formen und aus dem Schwitzraum, Schmierflüssigkeit, gebrauchsfertige Schimmelkultur und Endprodukte (Gelb- und Schimmelkäse). In dem Schnittkäse herstellenden Betrieb wurden Proben von Rohmilch, pasteurisierter Milch, Säureweckerkultur, Bruch-Molke-Gemisch, Salzbad, Käse vor und nach dem Salzbad sowie Endprodukte entnommen.

In den als kritisch erkannten Bereichen innerhalb eines Betriebes wurden anschließend gezielte Umgebungsuntersuchungen durchgeführt. Dazu zählten Proben von Rückständen aus den Produktionslinien, Tupferproben von Maschinenteilen und Hilfsgeräten, welche direkt mit den Produkten in Berührung kommen, Abstriche von solchen Maschinenteilen und Gerätschaften, die normalerweise keinen direkten Kontakt zum Produkt haben sowie Abstriche aus der Umgebung der Produktionsanlagen (von Wänden, Türen, Wasserhähnen, Kondenswasserabstriche und Gully-Inhalt). Mit dem Ziel, mögliche Eintrittspforten für>Listerien aufzuzeigen, wurden Kehricht vom Eingangsbereich, Verpackungsmaterialien und Transportpaletten sowie Stuhlproben des Personals untersucht.

Während der, auch aufgrund der eigenen Untersuchungen veranlaßten Sanierung wurden wiederholt Endprodukte, Salzbaden, Schmierflüssigkeit und Gully-Inhalt untersucht.

3.1.1.2 Nährmedien und Reagenzien zum Nachweis von>Listerien

Selektives Anreicherungsmedium (EB) (Enrichment Broth):
(LOVETT et al., 1987)

Basisnährmedium:

Tryptone Soja Broth (Oxoid CM 129)	30 g
Hefeextrakt (Merck 3753)	6 g
Aqua dest.	1000 ml

Basisnährmedium mit Puffer (gepufferte EB):

Tryptone Soja Broth (Oxoid CM 129)	30 g
Hefeextrakt (Merck 3753)	6 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck 6579)	18 g
KH_2PO_4 , wasserfrei (Merck 4871)	3 g
Aqua dest.	1000 ml

Basisnährboden lösen, in 500 ml Flaschen zu 220 ml abfüllen, und autoklavieren (121°C, 15 min).

Supplement I:

Acriflavin (Sigma A-8251)	15 mg
Nalidixinsäure (Sigma N-4382)	40 mg
Aqua dest.	10 ml
Lösen und steril filtrieren.	

Supplement II:

Cycloheximid (Sigma C-6255)	50 mg
Ethanol	4 ml
Aqua dest.	6 ml
Cycloheximid in Ethanol und Aqua dest. lösen und steril filtrieren.	

Basisnährboden und Supplemente werden getrennt aufbewahrt und erst unmittelbar vor dem Ansatz gemischt, indem von den Stammlösungen der Supplemente jeweils 2,5 ml zu 220 ml Basisnährboden gegeben werden.

Unteranreicherung:

Zu 10 ml des Basisnährbodens werden je 0,1 ml von Supplement I und II gegeben.

KOH-Lösung:

KOH (Merck 5033)	0,5 g
Aqua dest.	100 ml
Lösen, zu 9 ml in Röhrchen abfüllen und autoklavieren (121°C, 15 min).	

Isolierungs-Nährböden

Modifizierter McBride-Agar (MMA):
(LOVETT et al., 1987)

Basisnährboden:

Phenylethanol-Agar (Scott 3900-3521)	42,5 g
Glycin-Anhydrid (Sigma G-7251)	10,0 g
Lithiumchlorid (Sigma L-0505)	0,5 g
Aqua dest.	1000 ml
Basisnährboden lösen und autoklavieren (121°C, 15 min).	

Supplement:

Cycloheximid (Sigma C 6255)	200 mg
Ethanol	4,0 ml
Aqua dest.	6,0 ml
Cycloheximid in Ethanol und Aqua dest. lösen und steril filtrieren .	

Nach dem Autoklavieren wird der Basisnährboden auf 45 bis 50°C abgekühlt. Zu 1 l des Nährbodens werden 10 ml des steril filtrierten Supplementes gegeben und gut gemischt. Der Nährboden wird in Petrischalen (Greiner 633102, Durchmesser 9,4 cm) dünn ausgegossen (10 bis 12 ml) und bis zum Gebrauch bei 4°C (maximal eine Woche) gelagert.

Lithiumchlorid-Phenylethanol-Moxalactam-Agar (LPMA):
(LEE und McCLAIN, 1986)

Basisnährboden:

Phenylethanol-Agar (Scott 3900-3251)	42,5 g
Glycin-Anhydrid (Sigma G-7251)	10,0 g
Lithiumchlorid (Sigma L-0505)	5,0 g
Aqua dest.	1000 ml

Supplement:

Moxalactam (Eli Lilly)	200 mg
Ringerlösung	10 ml
Lösen und steril filtrieren.	

Nach Lösen, Autoklavieren (121°C, 15 min) und Abkühlen auf 45 bis 50°C werden dem Basisnährboden 10 ml des Supplementes zugegeben und dünn in Petrischalen (10 bis 12 ml) ausgegossen. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C maximal zwei Wochen.

Nichtselektive Nährböden

Trypton-Soja-Agar mit Hefe:

Trypton-Soja-Agar (Oxoid CM 131)	40 g
Hefeextrakt (Merck 3753)	6 g
Aqua dest.	1000 ml
Lösen, autoklavieren (121°C, 15 min) und dünn ausgießen (12 bis 14 ml pro Petrischale).	

Trypton-Soja-Schrägagar:

Trypton-Soja-Agar (Oxoid CM 131)	40 g
Aqua dest.	1000 ml

Lösen, zu 6 ml in Röhrchen abfüllen, autoklavieren (121°C, 15 min) und in schräger Lage abkühlen lassen.

Blutagar:

Blutagar-Basis-Nr. 2 (Oxoid CM 271)	40 g
Aqua dest.	1000 ml

Nach Lösen, Autoklavieren (121°C, 15 min) und Abkühlen auf 45 bis 50°C werden dem Nährboden 7% defibriniertes Schafblut (Oxoid FSR 1055) zugegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und in Petrischalen (18 bis 20 ml) ausgegossen.

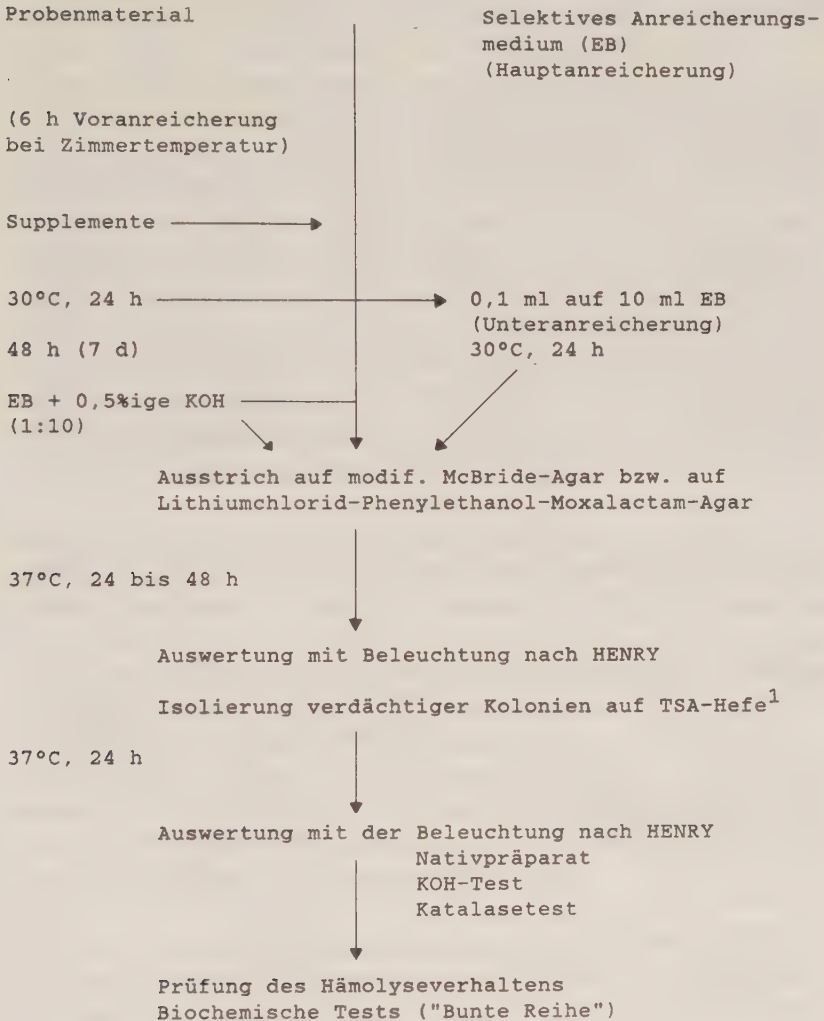
Um falsch-negative Hämolysebefunde - hervorgerufen durch Antikörper gegen Hämolsine der Teststämme - auszuschließen, wurde jede Blutcharge in einem Vorversuch mit Referenzstämmen geprüft.

Für die weitere Differenzierung der *Listeria*-Spezies wurden Nährmedien und Reagenzien analog der Methode der Food and Drug Administration (FDA-Methode) verwendet (LOVETT et al., 1987).

3.1.2 Methodik des *Listeria*-Nachweises

Der Nachweis der *Listeria* erfolgte in Anlehnung an die FDA-Methode (Abb. 3).

Abbildung 3: Nachweis von Listerien in Milch, Milchprodukten und Umgebungsproben



¹ TSA-Hefe = Trypton-Soja-Agar mit Hefe.

25 g oder 25 ml des zu untersuchenden Materials wurden 1:10 mit EB vermischt. Festeres Untersuchungsmaterial wie Käse wurde vorher mit ca. 100 ml EB im Stomacher (LAB-Blender 400) homogenisiert. Abstrichproben wurden je nach Tupfergröße mit 10 bzw. 100 ml EB versetzt. Bei Abwasserproben (Gully-Inhalt) wurden etwa 500 ml Probenmaterial zentrifugiert (3000 U/min; 20 min) und der Überstand bis auf etwa einen Rest von 50 ml, den Bodensatz eingeschlossen, abgegossen. Das vorhandene Sediment wurde resuspendiert und die Flüssigkeit in EB 1:10 angesetzt. Eine Voranreicherung in nichtselektivem Anreicherungsmedium, d.h. ohne Supplementzusatz, wurde der Anreicherung vorgeschaltet, wenn Proben mit möglicherweise vorgeschädigter Keimflora untersucht wurden (Tab.9). Hierzu wurden die Proben 4 bis 6 h bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz anschließend mit den Selektivstoffen supplementiert. Bei sehr sauren Proben ($\text{pH} < 5,0$) wurden Voranreicherung und Anreicherung in gepufferter EB durchgeführt.

Tabelle 9: Proben, die einer Voranreicherung unterzogen wurden

Art der Probe	Faktoren, die eine Schädigung der Listerien bewirken können
pasteurisierte Milch	Hitze
Bruch-Molke-Gemisch	Hitze, Säure
frischer Käse	Hitze, Säure
Salzbad	Säure, Salz
Sauermilchquark	Säure
frischer Sauermilchkäse	Säure
Kaseinat	Hitze, Säure

Stuhlproben (1 g) wurden 1:100 in EB verdünnt und im Stomacher homogenisiert.

Bei allen Proben erfolgte die Bebrütung der Anschüttelung bei 30°C. Nach 24 h Inkubation wurden 0,1 ml der Hauptanreicherung in 10 ml EB überführt (Unteranreicherung) und ebenfalls bei 30°C bebrütet.

Nach zwei- und nach siebentägiger Bebrütung wurden aus der Hauptanreicherung, nach 24 h Bebrütung aus der Unteranreicherung je eine Öse Material auf MMA, bei späteren Untersuchungen vergleichend auch auf LPMA ausgestrichen. In orientierenden Versuchen wurde bei einem Teil der Proben die Effektivität eines KOH-Verdünnungsausstrich überprüft. Hierzu wurde 1 ml der Anreicherung mit 9 ml 0,5% KOH-Lösung verdünnt, gemischt und sofort auf MMA ausgestrichen..

Nach 24 bzw. 48 stündiger Inkubation der Isolierungsmedien bei 37°C erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Schräglichttechnik nach HENRY. Listerien verdächtige Kolonien wurden zur Isolierung auf den nichtselektiven Trypton-Soja-Agar mit Hefezusatz überimpft, 24 h bei 37°C bebrütet, nochmals im Schräglicht nach HENRY beurteilt und in Schnelltests (KOH-Test, Katalasebildungsvermögen, Nativpräparat) die Grundkriterien, die für die Zuordnung zur Gattung *Listeria* wichtig sind, überprüft. Im Nativpräparat wurden bei 1000-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop (Olympus BH-2) Aussehen und Beweglichkeit der Keime beurteilt.

Nach Möglichkeit wurde von mindestens fünf verdächtigen Kolonien das Hämolyseverhalten auf Schafblutagar getestet, wobei Stichbeimpfung und CAMP-Test (CHRISTIE et al., 1944) simultan auf einer Blutplatte durchgeführt wurden. Die Platten wurden 24 bis 48 h bei 37°C inkubiert. Im Stich zeigt *L. monocytogenes* eine deutliche β -Hämolysezone, während die von *L. seeli-*

geri nur sehr schwach sichtbar ist. *L. ivanovii* bildet eine stark ausgeprägte Hämolysezone. Für den CAMP-Test wurden ein β -toxinbildender *S. aureus*-Stamm und ein *R. equi*-Stamm diame-
tral ausgestrichen. Im rechten Winkel zu diesen beiden Stäm-
men wurden die zu testenden Isolate ausgestrichen. *L. monocy-*
togenes bildet im Bereich der β -Toxinzone des *S. aureus* eine
schalen- oder keilförmige Hämolysezone, die bei *L. seeligeri*
- wenn überhaupt - nur sehr schwach ausgebildet ist. *L.*
ivanovii zeigt in der Nähe des *R. equi*-Impfstriches eine Zone
mit besonders stark ausgeprägter totaler Hämolyse. Alle ande-
ren *Listeria*-Arten sind Hämolyse-negativ.

Entsprechend ihres Hämolyseverhaltens wurde je Probe minde-
stens ein Isolat von der Blutplatte in 6 ml Trypton-Soja-
Bouillon überimpft und 24 h bei 37°C bebrütet. Anschließend
wurden biochemische Tests analog der FDA-Methode (LOVETT et
al., 1987) vorgenommen ("Bunte Reihe"). Jedes Isolat wurde
zur Aufbewahrung auf Trypton-Soja-Schrägagar überimpft.

Ausgewählte Isolate wurden am Institut für Hygiene und Mikro-
biologie der Universität Würzburg serotypisiert.

3.1.3 Ergebnisse

3.1.3.1 Nachweis von Listerien in Käseereien

Die Ergebnisse der Stufenkontrolle im Produktionsablauf sind
in Tab. 10 zusammengestellt. Grundsätzlich wird zwischen dem
Käsereibereich (Kesselmilch, Lab, Kulturen, Zusatzstoffe,
Bruch, Molkeablauf, Salzbad) und dem Schmier- und Reifungsbe-
reich unterschieden. Dabei zeigte sich, daß der Schwerpunkt
der Listerienfunde im Schmier- und Reifungsbereich lokali-
siert ist. In einem Fall war daneben auch der Käsereibereich
(gebrauchsfertige Lablösung, Molke, Salzbad) betroffen. In
den Sauermilchkäsereien (G und H) waren im Quark-Kaseinat-Ge-
misch und in frischen und gereiften Käseresten, die als Star-

terkulturen zugesetzt werden und in Proben des Sauermilchquarkes (Betrieb G) Listerien nachweisbar. In zwei Betrieben (A und F) konnten bei der Stufenkontrolle keine Listerien nachgewiesen werden, in einem davon aber in Umgebungsproben.

Tabelle 10: Vorkommen von Listerien in Proben, die im Rahmen von Stufenkontrollen in verschiedenen Käsereien entnommen wurden

Be- trieb ¹	Roh- ware ²	Käserei- hilfs- u. zusatzstoffe ³	Bruch/ Molke ⁴	Salzbad	Schmier- flüssig- keit	Käse
A	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	+	+
C	-	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	+	+
E	-	-	-	-	+	-
F	-	-	-	-	-	-
G	+	+	+		+	+
H	-	-	+		-	+
I	-	-	-	+		-

¹ A bis F = Rotschmierekäsereien; G und H = Sauermilchkäsereien; I = Schnittkäsebetrieb;

² Rohmilch, pasteurisierte Milch, Sauermilchquark;

³ Lab, Kulturen, Gewürze, Kaseinat, Salze, Farbstoffe;

⁴ in Sauermilchkäsereien: Quark-Kaseinatgemisch.

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich im wesentlichen auf die als kontaminiert erkannten Areale (Tabb. 11 und 12).

Bei der kontaminierten Rohware handelte es sich um steril entnommene, entsäuerte Randschichten von Sauermilchquark mit pH-Werten zwischen 6,5 und 6,9. Die Proben stammten aus Säcken verschiedener Hersteller. In gebrauchsfertigen Lösungen von Lab, Rotschmierekulturen und in einer Kaseinatmischung konnten *Listerien* ebenfalls nachgewiesen werden.

Von den insgesamt 1020 untersuchten Proben aus den verschiedenen Käsereien waren in 266 (26%) Proben *Listerien* nachgewiesen worden. *L. monocytogenes* konnte 32 mal (3%) isoliert werden, dabei elf mal in Mischkultur mit *L. innocua*. In 255 Fällen (25%) wurden andere *Listeria*-Spezies (251 mal *L. innocua*, zweimal *L. seeligeri*, einmal *L. ivanovii* und einmal *L. grayi*) gefunden.

Tabelle 11: Vorkommen von Listerien in Ausgangsmaterial, Zwischenprodukten, Bereichen mit direktem Produktkontakt und Endprodukt

Art der Probe	Anzahl der Proben	Anzahl positiver Proben (Zahl der Isolate)	Listeria-Spezies ¹		
			L.m.	L.in.	L.s.
Ausgangsmaterial ²	70	4 (4)	0	4	0
Käsereihilfs- und Zusatzstoffe ³	59	4 (4)	0	4	0
Bruch/Molke ⁴	61	4 (4)	0	4	0
Abstriche von der Bruchportionieranlage	37	14 (14)	1	13	0
Abstriche von Geräten ⁵	26	9 (11) ⁶	1	9	0
Abstriche von Reifungsbrettern	72	10 (10)	0	10	0
Salzbad	40	10 (11)	2	9	0
Schmierwasser und Abstriche von der Schmieranlage	117	40 (41)	1	39	1
Käse	195	96 (107)	11	96	0
Gesamt	677	191 (206)	16	188	1

¹ Zeichenerklärung: L.m. = L. monocytogenes; L.in. = L. innocua; L.s. = L. seeligeri;

² Milch, Sauermilchquark;

³ Kulturen, Kaseinat, Gewürze, Farbstoffe, Salz;

⁴ in Sauermilchkäsereien: Quark-Kaseinat-Gemisch;

⁵ Stampfer, Plastikkisten für Käsereste, Bruchharfe;

⁶ in einer dieser Proben wurde L. grayi gefunden.

Tabelle 12: Vorkommen von Listerien im Umfeld der Produktionsanlagen

Art der Probe	Anzahl der Proben	Anzahl positiver Proben (Zahl der Isolate)	Listeria-Spezies ¹			
			L.m.	L.in.	L.s.	L.iv.
Abstriche von Anlageteilen ²	79	16 (17)	6	11	0	0
Abstriche von Geräten ³	75	18 (21)	7	14	0	0
Abstriche von Gebäudeteilen ⁴	60	8 (10)	1	7	1	1
Abstriche von Verpackungsmaterial ⁵	18	5 (5)	0	5	0	0
Kondenswasser und Befeuchtungswasser	48	3 (3)	1	2	0	0
Spülwasser	7	1 (1)	0	1	0	0
Gully-Inhalt	56	25 (26)	1	25	0	0
Gesamt	343	76 (83)	16	65	1	1

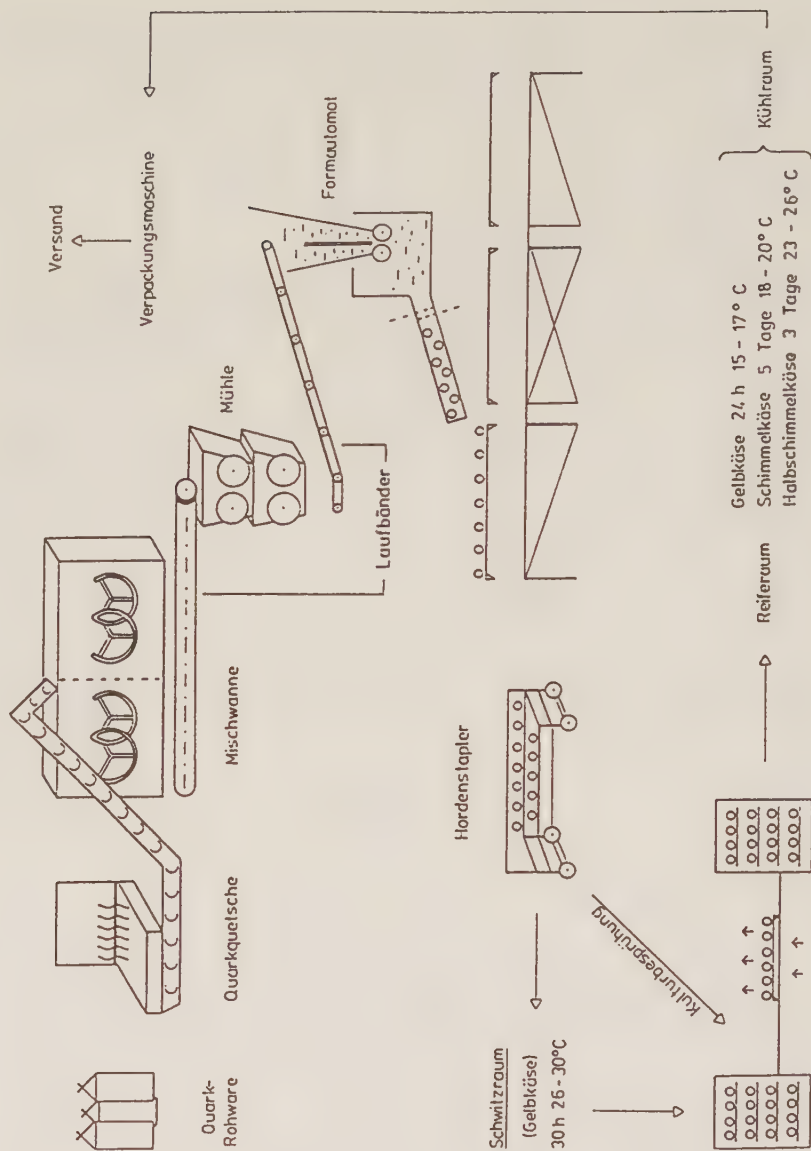
- 1 Zeichenerklärung: siehe Tab. 11, bzw. L.iv. = L. ivanovii;
- 2 Abstriche von den Außenflächen der Bruchwannen, der Bruchportionieranlage, der Abtropfbahnen, der Schmiermaschinen und von Brettergestellen;
- 3 Abstrichproben von Transportern, Hebekränen und Reinigungsgeräten;
- 4 Abstriche von Wänden, Böden, Decken, Fenster, Türen, Wasserhähnen;
- 5 Abstrichproben von Kartonagen, Kasein- und Quarksäcken.

Listerienfunde in den Sauermilchkäsereien (im Käsebereich) betrafen:

- Sauermilchquark;
- Quarkgemisch aus der Quarkmischwanne;
- Gequollenes Kaseinatgemisch;
- Quarkrückstände und Abstriche am Förderband der Wanne, am Brecher, an der Walze oberhalb des Schneckengetriebes, an den Kreuzen der Formautomaten und am Rührwerk der Mischanlage;
- Abstriche von der Außenfläche der Quark- und Kaseinatsäcke;
- Abstriche von Stampfern, Schabern, Reinigungsbürsten und Holzpaletten;
- Kulturenkäse und Käsereste.

Abb. 4 zeigt schematisch den Aufbau einer Produktionsanlage für Sauermilchkäse.

Abb. 4 : Schematischer Aufbau einer Produktionsanlage für Sauermilchkäse



Listerienfunde in einer Rotschmierekäserei (im Käseereibereich) betrafen:

- Abstriche von der Bruchportionieranlage:
Bodenplatte des Bruchverteilerkastens, Halterung des Bruchverteilerkastens (Bruchverteilerkasten wird darauf nach der Reinigung bis zur Wiederinbetriebnahme gelagert); Schaltpult, Preßluftanlage, Schutzverkleidung von Batterie und Motor, Messerhalterung, Ablage und sich darauf befindende Geräte (Ersatzschrauben, Schraubenschlüssel, Stampfer);
- Abstriche vom Haltegriff der Hochdruckreinigungsspritze;
- Abstriche von der Innenfläche des Warmluftverteilerrohres;
- Abstriche von der Innenseite der Verankerung der Bruchwannen;
- Abstriche von der Oberfläche eines Holztisches auf dem umgehordet wird;
- Abstriche von der Ladefläche der Hordentransportwagen;
- Abstriche vom Haken des Salzbadaufzuges;
- Salzbad;
- Gully-Inhalt.

Im Bruch-Molke-Gemisch vor dem Einlauf in die Portionieranlage und an den Bruchbereitungsgeräten (Bruchharfe, Rührstock, Bürste zum Ausbürsten der Wannen) konnten auch bei wiederholten Untersuchungen keine Listerien nachgewiesen werden.

Listerienfunde der untersuchten Rotschmiere- und Sauermilchkäsereien (im Schmier- und Reifungsbereich) betrafen:

- gebrauchsfertige Schmierlösung;
- Schmierlösung, während des Schmierens entnommen;
- Abstriche von Schmierbürsten;
- Abstriche von Auflage-, Seiten- und Abdeckflächen der Schmiermaschinen;
- Abstriche und Rückstand aus den seitlichen Endigungen der Sprühdüsenrohre und dem Steigrohr zum Manometer;

- Abstriche vom Steuerpult der Schmiermaschinen;
- Abstriche von Wänden, Türen, Wasserhähnen und Zuluftschächten; Kehricht und Abstrichproben vom Fußboden des Eingangs zu den Reifungsräumen;
- Proben des Ultraschallverdampferwassers und Abstriche aus den Kondenswasserauffangwannen der Kühlaggregate;
- Gully-Inhalt und Gully-Abstriche.

Listerienfunde in dem Schnittkäse herstellenden Betrieb:

- abgekratzter Rückstand von Plastikkisten, worin die gereinigten Formen aufbewahrt werden;
- Salzbad;
- Abstrich vom Fußboden neben dem Salzbad;
- Abstrich von der Ladefläche eines Hordentransportwagens;
- Fußbodenabstrich;
- Gully-Inhalt-Sammelprobe aus der Käserei.

3.1.3.2 Nachweis von Listerien in Stuhlproben

Mit dem Ziel, Eintrittspforten für Listerien in den Betrieb aufzuzeigen, wurden 41 Stuhlproben von Beschäftigten zweier Betriebe untersucht. Die Personen stammten aus verschiedenen Arbeitsbereichen (Käserei, Umhordung, Salzbad, Schmierung, Verpackung). Die Auswahl erfolgte stichprobenartig. In 17% der Proben wurden Listerien nachgewiesen, wobei fünfmal *L. monocytogenes* in Mischkultur mit *L. innocua* und zweimal *L. innocua* allein isoliert wurden (Tab. 13).

Um einen Überblick über die Ausscheidungsdauer zu erhalten, wurde 14 Tage später bei Personen mit einem positiven Listerienbefund eine zweite Stuhluntersuchung durchgeführt. Dabei wurde in zwei Fällen *L. innocua* nachgewiesen. Beim Erstbefund dieser Personen waren Mischkulturen aus *L. monocytogenes* und *L. innocua* isoliert worden. Zur Absicherung dieser Befunde wurde das Hämolyseverhalten von 30 Listerien-Kolonien pro Stuhlprobe getestet.

Tabelle 13: Listeriennachweis in Stuhlproben

	Anzahl der Proben	Anzahl posi- tiver Proben (Zahl der Isolate)	Listeria-Spezies ¹	
			L.m.	L.in
Erstunter- suchung	41	7 (12)	5	7
Wiederholungs- untersuchung (bei Ausschei- dern)	7	2 (2)	0	2
Gesamt	48	9 (14)	5	9

¹ Zeichenerklärung: L.m. = L. monocytogenes; L.in. = L. innocua.

Der Nachweis der Listerien erfolgte wie in 3.1.2 beschrieben. Bei einem Teil der Proben wurde die Effektivität eines KOH-Verdünnungsausstriches überprüft. Dieser erwies sich jedoch als nicht effektiv. Daher wurde in den weiteren Untersuchungen auf den KOH-Verdünnungsausstrich verzichtet (Daten nicht gezeigt).

3.2 Modellversuche zur Keimdynamik von Listerien

3.2.1 Listerienvermehrung in Schnittkäse

3.2.1.1 Material

Kesselmilch; erhitzt (74°C; 40 s)	150,0 kg
Säurewecker A12; thermophile Milchsäure- streptokokken (Milchwirtschaftliche Unter- suchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu))	1,3 l
Naturlab; Labstärke 1:15000 (Chr. Hansen's La- boratorium GmbH)	27 ml
Reifungsfolien (Dixie-Union Verpackungen GmbH)	
L. innocua Serovarietät (Sv.) 6b	
Ringerlösung	

3.2.1.2 Methodik

Herstellung der Listeriensuspension:

Der verwendete Listerienstamm (L. innocua Sv.6b) aus Sauermilchkäse isoliert, wurde in 10 ml Trypton-Soja-Bouillon überimpft und 24 h bei 37°C bebrütet. Die zu erwartende Keimzahl wurde in fünf Vorversuchen mittels Ausspatelung auf Trypton-Soja-Agar mit Hefeextrakt und 24 h Bebrütung bei 37°C ermittelt. In der Absicht, etwa 10 Keime/ml Kesselmilch für den Versuch einzusetzen, wurde eine Verdünnungsreihe in steriler Ringerlösung angelegt und ein entsprechendes Volumen der Kesselmilch zugesetzt.

Käseherstellung:

150 kg der erhitzten Milch (2,7% Fett) wurden 23 h bei 5°C in Aluminium-Milchkannen gelagert und anschließend in einer doppelwandigen Wanne unter ständigem Rühren auf 31°C erwärmt. Bei 17°C erfolgte die Zugabe der Listeriensuspension. Säurewecker und Lab wurden bei 31°C zugegeben.

Nach einer Dickungszeit von 40 min wurde der Bruch geschnitten und nach weiteren 10 min verzogen. 18 min nach dem Schneiden des Bruches wurden 50 l Molke abgeschöpft und durch 50 l temperiertes Wasser ersetzt. 45 min später wurde der Bruch in sechs Formen (25 x 11,5 x 11 cm) gefüllt und mit einer hydraulischen Käsepresse bei 6 bar 165 min gepreßt. Anschließend wurden die Käse aus der Form genommen und für 27 h in das Salzbad gelegt. Danach wurden die Käse 17 h bei 10°C abgetrocknet, gewogen (durchschnittliches Gewicht: 2,3 kg) und in handelsübliche Reifungsfolien vakuumverpackt. Die Reifung der Käse erfolgte bei 8°C, die Lagerung bei 4°C (ab der 14. Woche), beides bei 80% rel. Luftfeuchtigkeit.

Der Produktionsverlauf ist in Tab. 14 unter Berücksichtigung des pH-Wertes zusammengefaßt.

Tabelle 14: Herstellung von Edamerkäse aus listerienkontaminierter Kesselmilch

	Tag (d)	Stunde (h)	Temperatur (°C)	pH
Kesselmilch	1	0	5	6,7
Säureweckerzugabe		0,75	15	6,8
Listerienzugabe		1	17	-
Labzugabe		1,75	31	6,6
Bruch schneiden, verziehen		2,5	-	-
Bruch nachwärmen		3	-	6,7
Bruch abfüllen		3,5	-	-
- Molke			-	6,7
- Bruch			-	6,6
Pressen		3,5 bis 6,25		
- Sammelmolke			-	6,7
- Käseinneres			-	5,5
Salzbad (17% NaCl)	2		20	4,7
Trocknen	3		10	
Folienverpackung	4			
Reifung und	4 bis 90		8	
Lagerung	ab 90		4	

Probenentnahme zum Nachweis von Listerien:

Folgende Proben wurden vor und während Herstellung, Reifung und Lagerung des Käses entnommen und auf ihren Listeriengehalt untersucht:

1. Erhitzte Milch, Säurewecker, Lab und frisches Salzbad
2. Kontaminierte Milch, Molke (unverdünnt), Bruch, Sammelmolke (während des Pressens) und Salzbad (nach dem Salzen des Käses)
3. Durchschnittsproben vom Käse vor und nach dem Salzbad
4. Käsoberfläche und -inneres während verschiedener Stadien von Reifung und Lagerung.

Der Listeriennachweis wurde wie in 3.1.2 beschrieben durchgeführt, die Anreicherung erfolgte in EB. Als Isolierungsmedium diente der MMA.

Die zur Käseproduktion verwendeten Ausgangsmaterialien (erhitzte Milch, Säureweckerkultur, Lab und frisches Salzbad) wurden qualitativ (25 ml Probenmaterial in 225 ml EB) untersucht.

Bei allen anderen Proben wurde der Listeriengehalt mit Hilfe des MPN-Verfahrens quantitativ untersucht, wobei jeweils von 10 g Probenmaterial in 90 ml Verdünnungsflüssigkeit (Ringerlösung) ausgegangen wurde. Zur Beurteilung wurde nur die Unteraanreicherung herangezogen.

Ab dem dritten Tag nach der Herstellung wurde der Listeriengehalt im Inneren und auf der Oberfläche der Käse getrennt untersucht.

Gleichzeitig wurden bei der Probenentnahme der pH-Wert und ab der fünften Reifungswoche auch der a_w -Wert auf der Oberfläche und im Inneren der Käse bestimmt.

Trockenmasse, Kochsalz- und Fettgehalt wurden im chemischen Laboratorium der Milchwirtschaftlichen Untersuchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu) bestimmt.

3.2.1.3 Ergebnisse des Käsereiversuches

Um zu untersuchen, ob Listerien auch in foliengereiftem Schnittkäse über längere Zeit überleben können, wurde Edamer aus listerienkontaminierter Kesselmilch hergestellt.

In den Ausgangsmaterialien (erhitzte Milch, Säurewecker, Lab und frisches Salzbad) konnten keine Listerien nachgewiesen werden.

Aus Tab. 15 wird ersichtlich, daß die Keime im Bruch um das 16-fache angereichert wurden, während sie in der Molke unter die Nachweisgrenze ausverdünnt wurden. Mit Einsetzen der Säue-

rung ging der Listeriengehalt im Käsebruch vorübergehend wieder zurück. Tab. 16 zeigt, daß drei Tage nach der Herstellung die Listerienkonzentration an der Oberfläche höher als im Inneren der Käse war, aber ab dem sechsten Tag der Listeriengehalt an der Oberfläche immer gleich oder geringer dem im Käseinneren war. Die Wasseraktivitätsmessungen ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen Käsoberfläche und -innerem.

Die fertigen Käse entsprachen in Trockenmasse, Kochsalz- und Fettgehalt, Wasseraktivität und pH-Wert den allgemeinen Qualitätsanforderungen für Edamerkäse.

Tabelle 15: Keimdynamik von Listerien und pH-Werte in der Anfangsphase der Herstellung von Schnittkäse (1./2. Tag)

	Keimzahl CFU ¹ /ml (g)	pH
Kontaminierte Kesselmilch	2,5	6,7
Molke	0	6,6
Bruch	40	6,6
Sammelmolke	0	6,7
Käse vor dem Salzbad ²	25	5,5
Käse nach dem Salzbad ²	95	-

¹ CFU = koloniebildende Einheiten (colony forming units);

² Käsedurchschnittsprobe.

Tabelle 16 : Vermehrung von Listerien in foliengereiftem Schnittkäse während der Reifung

Tage (d) nach der Herstellung		Käseoberfläche			Käseinneres		
		CFU/g	pH	a_w	CFU/g	pH	a_w
3 d		200	5,6	- ¹	17	5,6	-
6 d		20	5,6	-	1100	5,7	-
8 d		250	5,6	-	4500	5,6	-
14 d		250	5,7	-	11000	5,5	-
21 d		250	5,7	-	1500	5,6	-
28 d		250	5,8	-	11000	5,6	-
35 d		2500	5,8	0,94	2500	5,6	0,94
42 d		120	5,7	0,94	400	5,7	0,94
49 d		250	5,7	0,94	2500	5,8	0,94
63 d		450	5,7	0,93	300	5,7	0,93
77 d		110	5,8	0,93	2500	5,8	0,93
91 d		450	5,7	0,95	1500	5,6	0,94
105 d		45	5,7	0,94	4500	5,8	0,93

¹ nicht bestimmt.

3.2.2 Einfluß von Mycoderma-Hefen auf die Listerienvermehrung

3.2.2.1 Material

Kesselmilch, erhitzt (74°C; 40s)

Säurewecker MS1; mesophile Milchsäurestreptokokken (Milchwirtschaftliche Untersuchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu))

Naturlab; Labstärke 1:15000 (Chr. Hansen's Laboratorium GmbH)

Bacterium linens Reinkultur C (Milchwirtschaftliche Untersuchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu))

Hefekultur: Candida valida, syn. mycoderma (Milchwirtschaftliche Lehr- und Versuchsanstalt Hannover-Ahlem)

L. innocua Sv.6b

3.2.2.2 Methodik

Es hatten sich Anhaltspunkte dafür ergeben, daß Mycoderma-Hefen einen Einfluß auf die Vermehrung von Listerien auf der Oberfläche von Rotschmierkäsen haben könnten. Dies sollte in zwei Versuchen an Romadurkäse geprüft werden. Im ersten Versuch wurden der Kesselmilch, im zweiten der ersten Schmierflüssigkeit Listerien (L. innocua Sv.6b, ein Isolat aus einer Schmiermaschine für Münsterkäse) zugesetzt. Zur Kesselmilch wurden etwa 4 Keime/ml Milch und ins Schmierwasser etwa 6×10^4 Keime/ml Schmierlösung gegeben. Bei jedem Versuch wurden 48 h nach der Herstellung die Hälfte der Käse für 30 min in eine Hefe-Wasser-Suspension (Versuch 1: $5,6 \times 10^4$ Hefen/ml; Versuch 2: $7,8 \times 10^4$ Hefen/ml) getaucht, die Kontrollgruppe für 30 min in 500 ml Wasser (Tab. 17).

Tabelle 17: Herstellung von Romadurkäsen aus listerienkontaminierter Kesselmilch

	Tag (d)	Stunde (h)	Temperatur (°C)	pH
Kesselmilch	1	0	10	
Listerienzugabe				
Säureweckerzugabe		0,25	16	
Labzugabe		1,25	34	
Bruch schneiden		2,45	29	
und abfüllen				
- Bruch				6,4
- Molke				6,6
Salzbad (17% NaCl)	2		20	4,7
Trocknen der Käse	3		23	
"Hefetauchbad" ¹			19	4,9 ²
Schmieren (4x) ³	4 bis 11		17	
Lagerung der Käse (80% rel. Luftfeuchtigkeit)			8	

- ¹ Die Hälfte der Käse wurde für 30 min in eine Hefe-Wasser-Suspension getaucht, die Kontrollgruppe in Wasser;
- ² pH der Käsoberfläche;
- ³ Die Käse wurden in Schmierlösung getaucht, immer zuerst die ohne Hefebehandlung.

Die Produktion beim zweiten Käsereiversuch verlief, analog den in Tab. 17 gezeigten Daten, allerdings mit dem Unterschied, daß die Listerienkontamination erst mit dem ersten Schmieren stattfand.

Listeriennachweis und Probenentnahme erfolgte wie in 3.2.1.2 beschrieben. Abweichend hiervon wurde nur die Käseoberfläche, jeweils 25 g eines Käses mit und ohne Hefebehandlung, untersucht.

3.2.2.3 Ergebnisse

Auch bei der Herstellung von Rotschmierekäse aus mit Listerien kontaminierter Kesselmilch war eine Anreicherung der Listerien im Bruch (45 CFU/g) zu verzeichnen. Mit zunehmender Säuerung kam es zu einer Abnahme des Listeriengehaltes, so daß in einer Käsedurchschnittsprobe des 24 h alten Käses nur noch 0,4 Keime pro Gramm Käse feststellbar waren. 13 Tage nach der Herstellung war eine Zunahme des Listeriengehaltes an der Käseoberfläche zu verzeichnen. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Entsäuerung der Oberfläche bereits den Neutralpunkt erreicht. Ab dem 20. Tag war die Zunahme deutlich erkennbar (Tab. 18).

Bei den Käsen, die während des Schmierens kontaminiert worden waren, konnte ein hoher Listeriengehalt nach 48 h festgestellt werden, der jedoch im Laufe der folgenden Tage wieder abnahm. Erst fünf Tage nach dem Verpacken der Käse zeichnete sich wieder eine Zunahme des Listeriengehaltes an der Oberfläche ab (Tab. 19).

Die Behandlung der Käseoberfläche mit Mycoderma-Hefen hatte, wie die Tab. 18 und 19 zeigen, keinen signifikanten Einfluß auf das Listerienvorkommen - weder bei Listerienkontamination durch die Kesselmilch, noch durch den Schmiervorgang.

Tabelle 18: Listeriennachweis an der Oberfläche von künstlich über die Käsereimilch kontaminierten Rotschmierekäsen mit und ohne Hefebehandlung

Art der Probe	Käse ohne Hefebehandlung		Käse mit Hefebehandlung	
	CFU/g	pH	CFU/g	pH
Bruch	45	6,6		
Käse vor dem Salzbad	0,4	5,1		
Käse, 6-Tage alt	0,4	5,1	0,6	5,3
Käse, 8-Tage alt	0	6,3	0,4	6,5
Käse, 13-Tage alt	20	-	110	-
Käse, 20-Tage alt	25	7,7	$4,5 \times 10^3$	7,4
Käse, 28-Tage alt	$4,5 \times 10^3$	-	$1,1 \times 10^5$	-

Tabelle 19: Nachweis von Listerien an der Oberfläche von Rotschmierekäsen, die während des ersten Schmierens kontaminiert wurden

Tage nach der Herstellung	Käse mit Hefebehandlung		Käse ohne Hefebehandlung	
	CFU/g	pH	CFU/g	pH
5	$4,5 \times 10^3$	4,8	$4,5 \times 10^3$	5,1
7	$4,5 \times 10^2$	5,1	$7,5 \times 10^2$	5,7
9	$1,5 \times 10^2$	5,6	$7,0 \times 10$	5,9
12	$2,5 \times 10$	7,0	$4,5 \times 10$	6,6
18	$4,5 \times 10$	-	$4,5 \times 10$	-

3.2.3 Versuche zur Kontamination der Oberfläche von Fetakäse

3.2.3.1 Material

Fetakäse (nach dem Salzbad)

Salzlake (pH 2,3; NaCl-Gehalt 9,3%)

L. innocua Sv.6b

Fetakäse, Salzlake und Verpackungsdose wurden von einem Hersteller zur Verfügung gestellt.

3.2.3.2 Methodik

Mit dem Ziel, zu prüfen, ob Listerien bei in Salzlake gelagerten Käsen überleben können, wurde die Oberfläche von Fetakäsen 48 h nach der Produktion mit *L. innocua* kontaminiert. Hierzu wurden die Käse für 30 min in eine Listeriensuspension (Herstellung siehe 3.2.1.2) mit etwa 10^7 Keimen/ml gelegt und 8 h bei 17°C und 80% rel. Luftfeuchtigkeit getrocknet. Anschließend wurden die Käse in die Verpackungsdose geschichtet, mit Salzlake bedeckt und luftdicht verschlossen bei einer Temperatur von 10°C gelagert.

Nicht kontaminierter Käse und Salzlake wurden qualitativ auf Listerien untersucht. Beim kontaminierten Käse wurden jeweils 10 g der Käsoberfläche untersucht. Der Listeriennachweis erfolgte wie in 3.2.1.2 beschrieben.

3.2.3.3 Ergebnisse

Der Listeriengehalt der Käse nahm während des Untersuchungszeitraumes langsam ab. In der 10. Woche nach der Kontamination waren noch 15 Keime pro Gramm Käse nachweisbar (Tab. 20). Der pH-Wert der Salzlake erhöhte sich während des Untersuchungszeitraumes von pH 2,3 auf pH 4,3.

Tabelle 20: Nachweis von Listerien an der Oberfläche von Fetakäse

Probenentnahme (Tage nach der Kontamination)	Keimzahlen CFU/g
5	$> 1,1 \times 10^4$
8	$1,1 \times 10^5$
12	$4,5 \times 10^4$
15	$1,1 \times 10^5$
18	$7,5 \times 10^4$
Salzlake (pH 4,3) ¹	$2,5 \times 10^3$
20	$4,5 \times 10^3$
24	$2,0 \times 10^4$
31	95
38	750
50	15

¹ Listeriengehalt der Salzlake 18 Tage nach der Kontamination

3.2.4 Versuche zur Kochsalztoleranz von Listerien

3.2.4.1 Material

Kochsalzlösungen (25, 20, 15, 12,5 und 10 Gew.-%-NaCl) wurden zu 9 ml abgefüllt und bei 121°C 15 min autoklaviert.

L. innocua Sv.6b (2×10^5 CFU/ml): Isolat aus einer Schmiermaschine für Münsterkäse;

L. innocua Sv.6a (2×10^8 CFU/ml): Isolat aus Schmierflüssigkeit für Rotschmierkäse;

L. monocytogenes Sv.1/2b (1×10^6 CFU/ml): Isolat von der Außenfläche einer Schmiermaschine

L. monocytogenes Sv.1/2b (4×10^7 CFU/ml): Isolat aus einem Rotschmierkäse;

L.seeligeri Sv.1/2b (6×10^7 CFU/ml): Isolat aus einem Käse.

3.2.4.2 Methodik

Mit dem Ziel die Salztoleranz verschiedener *Listeria*-Spezies zu prüfen, wurden Listerien in unterschiedlich konzentrierte Kochsalzlösungen überimpft.

Zu 9 ml der Kochsalzlösungen wurden 0,5 ml der *Listeriensuspensionen* mit Keimzahlen zwischen 10^5 und 10^8 CFU/ml gegeben und 33 Tage bei Zimmertemperatur (18 bis 20°C) stehengelassen. Die Überlebensdauer der Listerien wurde täglich durch Ausstrich auf Trypton-Soja-Agar mit Hefeextrakt und Bebrütung bei 37°C (24 h) überprüft. Die Reinheit der gewachsenen Kolonien wurde im Schräglicht nach HENRY beurteilt.

Die Herstellung der Keimsuspensionen und Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgte wie in 3.2.1.2 beschrieben.

3.2.4.3 Ergebnisse

Aus Tab. 21 ist ersichtlich, daß Listerien in 15- bis 25%igen Kochsalzlösungen bis zu 13 Tagen überleben konnten. 12,5%ige Lösungen wurden von den fünf verwendeten Stämmen unterschiedlich lange toleriert. In 10%igen Lösungen waren nach 33tägiger Inkubation noch alle Listeria-Stämme vermehrungsfähig.

Tabelle 21: Überlebensdauer mehrerer Listeria-Stämme in verschiedenen konzentrierten Kochsalzlösungen während einer 33tägigen Lagerung

Listeria- Isolat	Überlebensdauer (Tage) nach der Inokulation in				
	10%	12,5%	15%	20%	25%-NaCl-Lösungen
L.in.Sv.6b	33	30	13	13	13
L.in.Sv.6a	33	12	12	12	9
L.m.Sv.1/2b	33	27	11	11	11
L.m.Sv.1/2b	33	11	12	12	12
L.s.Sv.1/2b	33	23	12	11	12

Zeichenerklärung für Abkürzungen: siehe Tab. 11.

3.3 Vergleich mehrerer Nachweismedien für Listerien

3.3.1 Material

3.3.1.1 Zum Listeriennachweis verwendete Nährmedien und Reagenzien

Selektive Anreicherungsmedien

FDA-Anreicherungsmedium (Enrichment Broth, EB):

(LOVETT et al., 1987)

siehe 3.1.1.2

USDA-Anreicherungsmedium für die Hauptanreicherung (Listeria Enrichment Broth, LEB):

(LEE und McCLAIN, 1986)

Proteose Pepton (Oxoid L85)	5,00 g
Trypton (Difco 0123-02)	5,00 g
Lab-Lemco Pulver (Oxoid L29)	5,00 g
Hefeextrakt (Merck 3753)	5,00 g
NaCl (Merck 6404)	20,00 g
KH_2PO_4 (Merck 4871)	1,35 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6579)	12,00 g
Nalidixinsäure (Sigma N-4382)	0,02 g
(gelöst in 1 ml 0,1 M NaOH)	
Aqua dest.	1000 ml

Das gelöste Basisnährmedium in 500 ml-Flaschen zu 225 ml abfüllen und 12 min bei 121°C autoklavieren. Eine Überhitzung ist zu vermeiden, deshalb das Nährmedium sofort abkühlen und kühl (4 bis 6°C) aufbewahren.

Supplement:

Acriflavin (Sigma A-8251)	120 mg
Aqua dest.	10 ml

Lösen und steril filtrieren.

Basisnährmedium und Supplement müssen getrennt aufbewahrt werden. Unmittelbar vor dem Ansatz werden 225 ml des Basisnährmediums mit 0,25 ml des Supplementes versetzt (= 12 mg Acriflavin/l).

USDA-Anreicherungsmedium für die Unteraanreicherung (LEB 1):

Das Basisnährmedium ist identisch mit dem der Hauptanreicherung. Es wird zu 10 ml abgefüllt und autoklaviert (121°C, 12 min). Zu 10 ml Basisnährmedium werden 0,1 ml Supplement gegeben (= 25 mg Acriflavin/l).

Supplement:

Acriflavin (Sigma A-8251)	25 mg
Aqua dest.	10 ml

Lösen und steril filtrieren.

Listeria-Anreicherungsbouillon für die Haupt- und Unteraanreicherung (LAB):

(BREUER und PRÄNDL, 1988)

Listeria-Anreicherungsbouillon (Merck, 10985)	26,0 g
Kaliumthiocyanat (Merck, 746A266725)	37,5 g
Aqua dest.	1000 ml

Das Anreicherungsmedium lösen, in 500 ml-Flaschen zu 225 ml (Hauptanreicherung) bzw. zu 10 ml in Röhrchen (Unteraanreicherung) abfüllen und 15 min bei 121°C autoklavieren.

Isolierungsnährmedien

Listeria-Selektivagar (LSA):

(BREUER und PRÄNDL, 1988)

Listeria-Selektivagar (Merck, 10986)	39 g
Aqua dest.	1000 ml

Nährboden lösen, autoklavieren und in dünner Schicht (10 bis 13 ml pro Petrischale) gießen.

Acriflavin-Ceftazidim-Agar (ACA):

(BANNERMAN und BILLE, 1988)

Basisnährboden:

Columbia-Agar (Oxoid CM 331)	44 g
Aqua dest.	1000 ml

Supplement I:

Acriflavin (Sigma A-8251)	40 mg
Aqua dest.	10 ml

Lösen und steril filtrieren.

Supplement 2:

Ceftazidim Pentahydrat (Fortum ^R , Glaxo Pharmazeutica GmbH)	200 mg
Aqua dest.	10 ml

Lösen und steril filtern.

Nach dem Lösen, Autoklavieren (121°C, 15 min) und Abkühlen des Basisnährbodens auf 45 bis 48°C werden pro Liter je 2,5 ml der Supplemente 1 und 2 zugegeben. Den Nährboden in dünner Schicht (10 bis 12 ml pro Petrischale) gießen.

Modifizierter McBride-Agar (MMA) und Lithiumchlorid-Phenylethanol-Moxalactam-Agar (LPMA)

(siehe 3.1.1.2)

3.3.1.2 Probenmaterial

L. monocytogenes Sv.1/2a und Sv.4b-Referenzstämme

Routinemäßig an die MUVA eingesandte Handelsproben aus dem In- und Ausland sowie Proben aus Status- und Umgebungsuntersuchungen in Käsereien (siehe 3.1.1.1).

3.3.2 Methodik

3.3.2.1 Vergleich von selektiven Listeria-Anreicherungsmedien

Mit dem Ziel, die Vermehrungsfähigkeit eines L. monocytogenes Sv. 1/2a-Referenzstammes und eines L. monocytogenes Sv.4b Referenzstammes in verschiedenen selektiven Anreicherungsmedien zu prüfen, wurde pro Stamm eine Öse Keimmaterial in je 10 ml der Anreicherungsmedien (EB, LEB, LAB) überimpft und 24 h bei 30°C bebrütet. Die erreichten Keimzahlen wurden durch das Tropfplattenverfahren (in Anlehnung an DIN 10161 Teil 70/2) auf verschiedenen Festnährböden (MMA, LPMA, ACA, LSA) ermittelt.

3.3.2.2 Listeriennachweis in einem künstlich kontaminierten Rotschmierenkäse

Der zum Versuch verwendete Rotschmierenkäse wurde vor Versuchsbeginn einem qualitativen Listeriennachweis unterzogen (Blindwert). Nachdem keine Listerien nachgewiesen werden konnten, wurden 25 g des Käses in 225 ml Ringerlösung homogenisiert. Dieser Stammansatz wurde mit etwa 2000 Keimen eines L. monocytogenes Sv.1/2a-Referenzstammes inokuliert.

In der Absicht, vier Nachweismethoden für Listerien vergleichend zu untersuchen, wurden jeweils 10 ml des Stammansatzes (= 1 g Probenmaterial) in die verschiedenen Anreiche-

rungsmedien überimpft. Mit Hilfe der MPN-Technik (siehe 3.2.1.2) wurde anschließend geprüft, ob die einzelnen Medien einen wachstumsfördernden oder -hemmenden Einfluß auf die Listerien haben (Tab. 22).

Tabelle 22: Nachweisverfahren für Listerien: Anreicherungsmedien und Nährböden¹

Nachweisverfahren	Anreicherungsmedium	Isolierungsmedium
FDA	EB	MMA
USDA	LEB	LPMA
BREUER und PRÄNDL (1988)	LAB	LSA
BANNERMAN und BILLE (1988)	EB	ACA

¹ Abkürzungen siehe 3.3.1.1.

3.3.2.3 Listeriennachweis durch Einsatz verschiedener Isolierungsnährmedien

Das Probenmaterial wurde, wie in 3.1.2 beschrieben, in Anlehnung an die FDA-Methode angereichert.

142 ausgewählte Proben aus Problembetrieben wurden auf vier Isolierungsnährböden (MMA, LPMA, ACA, LSA) ausgestrichen, wobei von 33 Proben die Hauptanreicherung nach 48 h und die Unteranreicherung nach 24 h, von 77 Proben dagegen nur die Hauptanreicherung nach siebentägiger Bebrütung auf das Vorhandensein von Listerien untersucht wurden. Bei 32 Proben hingegen wurden die Hauptanreicherung nach 48 h und nach 7 d und die Unteranreicherung nach 24 h Bebrütung ausgestrichen.

Nach dem zuletzt genannten Modus wurden anschließend 892 weitere Proben durch Einsatz des MMA und LPMA vergleichend untersucht.

Die Auswertung der Nährböden nach 24 h und nach 48 h Bebrütung und die weitere Differenzierung *Listeria*-verdächtiger Kolonien erfolgte analog 3.1.2.

3.3.3 Ergebnisse

3.3.3.1 Vergleich von *Listeria*-Nachweisverfahren

Anhand der Vermehrungsfähigkeit von zwei *L. monocytogenes*-Referenzstämmen (Sv.1/2a und Sv.4b) wurde die Effektivität von drei verschiedenen selektiven Anreicherungsmedien in Modellversuchen geprüft. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahlen erfolgte auf vier unterschiedlichen Selektivnährböden mit Hilfe des Tropfplattenverfahrens. Dadurch konnte gleichzeitig eine Aussage über einen Einfluß der Nährböden auf das *Listeria*-wachstum gemacht werden.

Aus den in Tab. 23 gezeigten Daten ist ersichtlich, daß in der EB die höchsten, in der LAB hingegen die geringsten Keimzahlen bei der Vermehrung eines *L. monocytogenes* Sv.1/2a-Stammes erzielt wurden.

Tabelle 23: Vermehrungsfähigkeit von *L. monocytogenes* Sv.1/2a in unterschiedlichen Anreicherungsmedien¹

Anreicherungs- medium	Keimzahlen (CFU/ml) Isolierungsnährböden			
	MMA	LPMA	ACA	LSA
EB	$3,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
LEB	$2,3 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$
LAB	$1,2 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$

¹ Abkürzungen siehe 3.3.1.1.

Da andere Autoren gezeigt haben, daß die L. monocytogenes-Stämme der Sv.4b empfindlicher gegenüber Selektivstoffen sind als Stämme anderer Serovarietäten (Terplan, 1988c), wurde ein analoger Versuchsansatz mit der Sv.4b durchgeführt. Dabei wurden jedoch im wesentlichen die gleichen Keimzahlen wie bei der Verwendung der Sv.1/2a erreicht (Daten nicht gezeigt).

Mit dem Ziel zu überprüfen, welche Verhältnisse bei Anwesenheit von Probenmaterial gegeben sind, wurde ein Rotschmierekäse mit L. monocytogenes Sv.1/2a kontaminiert und mit Hilfe der MPN-Technik die Effektivität der verschiedenen Nachweismethoden in gleicher Weise wie in vorhergehenden Versuchen getestet. Die höchsten Keimzahlen wurden gefunden, wenn in EB angereichert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.2 Vergleich unterschiedlicher Isolierungsnährböden

Um die vier verschiedenen Isolierungsnährböden (MMA, LPMA, ACA, LSA) auf ihre Eignung in der Routine-Listeria-Diagnostik zu prüfen, wurden 142 Proben aus Problembetrieben vergleichend untersucht. Als Anreicherungsmedium wurde die EB verwendet, da sie sich in den vorangehenden Versuchen hinsichtlich der Keimvermehrung als das geeignetste Medium erwiesen hatte (siehe 3.3.3.1).

Die Versuche zeigten, daß mit Einsatz des LPMA die meisten positiven Ergebnisse erzielt werden konnten (Tab. 24).

Tabelle 24: Vergleich unterschiedlicher Isolierungsmedien zum Nachweis von *Listeria*-Spezies

Anreicherungs- modus ¹	Proben- zahl	Anzahl positiver Proben				
		MMA	LPMA	ACA	LSA	Gesamt
2 d, se ²	33	12	18	15	11	18
2d, se, 7 d	32	10	11	8	3	12 ³
7 d	77	28	32	28	20	32
Gesamt	142	50	61	51	34	62 ³

¹ Anreicherung in EB;

² Unteranreicherung (Subenrichment);

³ Eine listerienhaltige Probe war auf dem LPMA negativ.

Der LPMA war im Vergleich zu den anderen Nährböden auch deutlich selektiver. Während auf dem MMA, ACA und LSA die Auswertung durch die starke Begleitflora meist erheblich erschwert wurde, war dies beim LPMA selten der Fall. Vor allem bei Auswertung nach 24 h beschränkte sich die Begleitflora auf dem LPMA meist auf einen kaum sichtbaren Schleier, so daß die Listerien praktisch als Reinkulturen vorlagen. Nach weiteren 24 h Inkubation waren dann neben den Listerien häufig kleine, weiß-gelblich glänzende Kolonien erkennbar: Katalase-negative Kokken. Waren listerienverdächtige Kolonien nach 24 h Bebrütung im Schleier eingebettet, erwies es sich als vorteilhaft diese abzuimpfen, da eine weitere Bebrütung das Wachstum der Begleitflora begünstigte. In einzelnen Fällen wurde jedoch beobachtet, daß listerienverdächtige Kolonien auf dem LPMA erst nach 48 h Bebrütung erkennbar waren.

In weiteren Untersuchungen wurde daher der LPMA aufgrund seiner höheren Nachweisrate und Selektivität mit dem bisher in der Routinepraxis eingesetzten MMA verglichen. Als Untersuchungsmaterial dienten hierbei an die Milchwirtschaftliche Untersuchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu) eingesandte Handelsproben aus dem In- und Ausland und Proben aus Status- und Umgebungsuntersuchungen, wobei der Probenanteil aus Problembetrieben etwa 40% ausmachte. Insgesamt wurden 892 Proben untersucht, wobei der Anteil Listeria-positiver Proben 31% betrug. Der LPMA brachte gegenüber dem MMA insgesamt 14%, in Abhängigkeit von der Probenart jedoch zwischen sieben und 50% (Abstrichproben bzw. Schnittkäse) mehr positive Befunde (Tab. 25).

Tabelle 25: Vergleich der Verteilungshäufigkeit von Listerien beim Nachweis in natürlich kontaminierten Proben mit zwei Isolierungsnährböden

Probenart	Probenzahl	Anzahl positiver Proben		
		MMA	LPMA	Gesamt
Sauermilchkäse	74	42	51	51
Rotschmierekäse	123	37	42	44
Schimmelkäse	46	5	5	5
Schnittkäse und halbfeste Schnittkäse	78	3	6	6
Hartkäse	2	0	0	0
Schmelzkäse	94	11	13	13
Schmierflüssigkeit	196	90	99	100
Salzbad	10	2	3	3
Abstriche	141	14	15	15
Gully-Inhalt	108	30	37	38
Fleischwaren	6	0	1	1
Bruch/Molke	14	0	0	0
Gesamt	892	234	272	276¹

¹ Vier der insgesamt 276 listerienhaltigen Proben waren auf dem LPMA negativ.

Bei der weiteren Differenzierung der *Listeria*-Spezies stellte sich heraus, daß es sich bei 15% der Listerienfunde um *L. monocytogenes* handelte, wobei 9% allein und 6% zusammen mit anderen *Listeria*-Spezies vorlagen.

Die in Tab. 26 wiedergegebenen Daten zeigen die 276 positiven Befunde in Abhängigkeit von Anreicherungsdauer und Isolierungsnährböden. Dabei fällt auf, daß der LPMA wesentlich früher zu positiven Werten führt, als der MMA. Beim LPMA waren 13% der auf diesem Nährboden positiven Befunde erst nach siebentägiger Anreicherung nachweisbar, beim MMA waren es 29%. Ein Vergleich der Effektivität der Unteranreicherung mit der Hauptanreicherung nach 48 Stunden ergibt, daß auf dem MMA mit der Unteranreicherung 1% (= 3 Proben) mehr positive Fälle erkannt wurden, als mit der Hauptanreicherung nach 48 Stunden. Beim LPMA wurden mit der Unteranreicherung sogar 3% (= 8 Proben) weniger erkannt. Die Kombination Unteranreicherung und siebentägige Hauptanreicherung führte auf LPMA und MMA in 98% der Fälle zu einem positiven Befund. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen, die mit den Ausstrichen der Hauptanreicherung nach 48 Stunden und siebentägiger Bebrütung erzielt wurden, so ist kein signifikanter Unterschied feststellbar - beim LPMA waren es ebenfalls 98%, beim MMA 96%.

Tabelle 26: Abhängigkeit des Listeriennachweises von 276 positiven Proben von verschiedenen Anreicherungszeiten sowie den Isolierungsnährböden¹

Hauptanreicherung		Unteranreicherung	Anzahl positiver Proben	
48 h	7 d	24 h	MMA	LPMA
+	-	-	6	6
-	+	-	69	34
-	-	+	9	5
+	+	-	18	20
-	+	+	18	13
+	-	+	8	6
+	+	+	109	188
Gesamt:				
MMA: 141	214	144	237	
(60%)	(90%)	(61%)		
LPMA: 220	255	212		272 ²
(81%)	(94%)	(78%)		

¹ Die in EB angereicherten Proben wurden nach 48 h und 7 d, die Unteranreicherung nach 24 h ausgestrichen;

² Vier der insgesamt 276 positiven Proben waren auf dem LPMA negativ.

Um einen Einfluß der Isolierungsnährböden auf das Wachstum der Listerien zu prüfen, wurden in weiteren Untersuchungen Reinkulturen der aus den 276 positiven Proben isolierten Listerien-Isolate vergleichend auf einen nichtselektiven Nährboden (Trypton-Soja-Agar mit Hefeextrakt) und auf die Selektivnährböden MMA und LPMA ausgestrichen und 24 h bis 48 h bei 37°C bebrütet. Dabei wurde beobachtet, daß *L. seeligeri*-Isolate in ihrem Wachstum auf dem LPMA gehemmt und teilweise sogar unterdrückt wurden. Häufig konnten sie sich jedoch nach anschließender vier- bis sechstägiger Bebrütung bei Zimmertemperatur doch noch durchsetzen. Auch auf dem MMA war das Wachstum der *L. seeligeri*-Isolate teilweise reduziert. Diese Beobachtung wurde nur bei *L. seeligeri*-Isolaten gemacht, nicht bei Isolaten anderer *Listeria*-Arten (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Ausgelöst durch mehrere Listeriose-Gruppenerkrankungen mit zahlreichen Todesfällen, die auf den Verzehr listerienhaltiger Lebensmittel zurückgeführt werden konnten, wurden weltweit Untersuchungen von verschiedenen Lebensmitteln durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß in Käse, insbesondere in Weichkäse gelegentlich *L. monocytogenes* nachgewiesen werden kann. Aufgrund des hohen Wassergehaltes von Weichkäse (67 bis 76%) laufen die mikrobiologischen Stoffwechselvorgänge während der Reifung schneller ab als bei anderen Käsesorten. Dies bedingt eine schnelle Entsäuerung der Oberflächenschicht, wodurch sich innerhalb weniger Tage erwünschte Keime (z.B. Weißschimmel, Rotschmierebakterien) und unerwünschte (Fremdschimmel, Listerien) auf der Käsoberfläche vermehren können. Da es sich bei Weichkäse um ein Produkt handelt, das gewöhnlich in rohem Zustand verzehrt wird, ist es die Pflicht der Hersteller eine Kontamination mit *L. monocytogenes* zu verhindern. Die Pasteurisierung gilt bei ordnungsgemäßer Durchführung als sicheres Verfahren, Listerien abzutöten (WHO, 1988; STEINMEYER, 1988). In keiner der in die eigenen Untersuchungen einbezogenen Käsereien waren Listerien in der pasteurisierten Kesselmilch nachweisbar, auch nicht nach wiederholt durchgeführten Überprüfungen. In einer Rotschmierekäserei wurden in der Bruchportionieranlage und deren Umfeld Listerien gefunden. Auch in diesem Betrieb konnte durch die eigenen Untersuchungen und betriebseigene Kontrolldaten praktisch ausgeschlossen werden, daß Listerien die Pasteurisierung überlebt haben. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Keime durch Rekontamination nach der Pasteurisierung in den Herstellungsprozeß gelangten. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren (BREER, 1987; BRANDL, 1988) überein, die ebenfalls Rekontaminationen während der Herstellung nachweisen konnten.

Um mögliche Kontaminationswege innerhalb einer Käserei aufzuzeigen, bedarf es der Kenntnis über Einschleppungs- und Vermehrungsmöglichkeiten. Bei den im Rahmen der eigenen Untersu-

chungen durchgeführten Umfeld- und Anlagekontrollen zeigte es sich, daß in allen Betrieben, in denen Listerien gefunden wurden, in erster Linie der Schmier- und Reifungsbereich betroffen war. In nur einer der Rotschmierekäsereien waren zusätzlich der Käsereibereich und das Salzbad kontaminiert. In den Sauermilchkäsereien ließ sich, vom Quarkgemisch ausgehend, die Kontamination durch den gesamten Betrieb verfolgen. Bei den in die eigenen Untersuchungen einbezogenen Käsereien handelte es sich um kleine bis mittlere Betriebe, in deren engerer und weiterer Umgebung sich landwirtschaftliche Anwesen befanden. Für diese Betriebe bietet der Außenbereich aufgrund des "landwirtschaftlichen Zyklus" (TERPLAN, 1988b) einen besonderen Kontaminationsdruck. Mehrere Autoren konnten in Erd- und Pflanzenproben sowie in Silage Listerien nachweisen (WEIS und SEELIGER, 1975; WELSHIMER und DONKER-VOET, 1971; GRONSTOL, 1980). SKOVGAARD und MORGEN (1988) haben 52% der von ihnen untersuchten Rinderkot- und 65% der Silageproben mit *L. monocytogenes* kontaminiert gefunden. Auf dem Lande ist deshalb der Einschleppungsgefahr durch verschmutzte Schuhe oder Räder (Gabelstapler, u.a.) besondere Bedeutung beizumessen. So ist es verständlich, daß am Eingang zum Reifungskeller einer Käserei im Kehrlicht und in Abstrichen vom Fußboden Listerien nachgewiesen werden konnten, zumal sich der Reifungskeller nicht im eigentlichen Betriebsgebäude, sondern in einem Nachbarhaus befand und nur durch Überqueren einer öffentlichen Straße erreichbar war. Diese Straße ist zugleich Zufahrtstraße zu einem landwirtschaftlichen Anwesen, das sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Käserei befindet. Dieses Beispiel zeigt die Wichtigkeit von Desinfektionsmatten an den Eingängen zu den Betriebsräumen vor allem dort, wo ein ständiges Wechseln der Schuhe für das Personal mit erheblichem Aufwand verbunden ist. Gerade bei Kleinbetrieben ist der Zutritt zu den Produktionsräumen oftmals nicht auf berechnete Personen beschränkt bzw. der Umkleideraum teilweise nur über einen Produktionsraum erreichbar, weshalb der Eingang durch Desinfektionsmatten geschützt werden sollte. Diese müssen mindestens täglich gereinigt werden und stets mit fri-

scher Desinfektionslösung getränkt sein. Die Wirksamkeit ist nur bei richtiger Dosierung und ausreichender Kontaktdauer (mindestens 30 s) (WEISSENFLUH, 1988) gewährleistet. Ob diese Zeit unter praktischen Bedingungen eingehalten werden kann, erscheint fraglich, so daß ein Schuhwechsel erwogen werden sollte. Eine weitere Gefahrenquelle ist das Tragen der Arbeitsschuhe und -kleidung außerhalb des Betriebes. Dies kann beobachtet werden, wenn die Beschäftigten in unmittelbarer Nähe wohnen und schon zu Hause die Arbeitskleidung anziehen. Daher sollte der Arbeitgeber die Arbeitskleidung zur Verfügung stellen und ebenso für ihre Reinigung Sorge tragen.

Auch kann gerade in Nachbarschaft von landwirtschaftlichen Gehöften, bei ungünstiger Windrichtung, die Keimeinschleppung über die Außenluft eine nicht unbedeutende Gefahr darstellen, weshalb Zugluft in den Produktions- und Reifungsräumen unter allen Umständen zu vermeiden ist. Durch Überdruckklüftung mit filtrierter Luft (KESSLER, 1988), wie sie in manchen milchwirtschaftlichen Betrieben angewandt wird, kann das Risiko minimiert werden. Für die Einrichtung einer solchen Anlage wären jedoch enorme Investitionen aufzuwenden, die bei vielen Klein- und Mittelbetrieben die Grenzen der Wirtschaftlichkeit überschreiten würden.

Der Mensch kann die Keime indirekt durch Schmutz und Staub an Schuhen, Kleidung oder Haaren in den Betrieb einschleppen. Er kann sie aber auch durch Unachtsamkeit oder unzulängliche Personalhygiene im Betrieb verteilen. Etwa 10% aller Menschen scheiden Listerien aus (ORTEL, 1975). In eigenen Untersuchungen wurden in Stuhlproben von Beschäftigten zweier Käsereien insgesamt 17% der Beschäftigten als positiv befunden. Auffallend dabei war, daß alle positiven Proben aus einem Betrieb mit ländlicher Umgebung stammten. In dieser Käserei waren bei einer Erstuntersuchung sieben von 17 Proben (41%) positiv, wobei *L. monocytogenes* fünfmal vorkam, immer in Mischkultur mit *L. innocua*. Bei den Ausscheidern wurde 14 Tage später eine Wiederholungsuntersuchung durchgeführt und nur noch in

zwei Fällen *L. innocua* nachgewiesen. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von KAMPELMACHER und VAN NOORLE-JANSEN (1972) sowie ORTEL (1975) weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß die Ausscheidung nicht permanent erfolgen muß und vermutlich jeder Mensch, zumindest vorübergehend, Listerien ausscheiden kann. In der zweiten, stadtnahe gelegenen Käserei waren die 24 Stuhlproben alle *Listeria*-negativ. Die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Umgebung der betreffenden Personen und dem Vorkommen von Listerien in Stuhlproben besteht, kann anhand der erhobenen Daten nicht abschließend geklärt werden. KAMPELMACHER et. al. (1972) untersuchten Faeces von Frauen aus der Landwirtschaft und konnten keine erhöhte Ausscheiderate gegenüber Kontrollgruppen feststellen. Auch ORTEL (1975) fand keinen Unterschied hinsichtlich der Listerienausscheidung zwischen Schlachthofarbeitern, bei denen aufgrund ihres Kontaktes mit Schlachttieren eine höhere Ausscheiderate vermutet werden könnte, und anderen Personengruppen. Da Listerien ubiquitär vorkommende Keime sind, die mit vielen Nahrungsmitteln aufgenommen (WEISE, 1987; ERDLE, 1988; BREER, 1988; BREUER und PRÄNDL, 1988; TERPLAN, 1988b) und über den Stuhl wieder ausgeschieden werden können, ist nicht auszuschließen, daß die hohe Ausscheiderate bei der Erstuntersuchung (41%) im ersten Betrieb auf die Gemeinschaftsverpflegung oder andere Verzehrsgewohnheiten zurückzuführen ist. Aufgrund der potentiellen Listerienübertragung durch den Menschen ist eine sorgfältige Personalhygiene von großer Bedeutung. Bei den eigenen Untersuchungen in verschiedenen Käsereien fiel auf, daß die ohnehin nur gelegentlich vorhandenen Wasch- und Desinfektionsgelegenheiten in den Produktions- und Reifungsräumen nur selten benutzt wurden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß diese Anlagen oft zu weit vom einzelnen Arbeitsplatz entfernt sind. Um eine effektive Personalhygiene zu erzielen, müssen deshalb ausreichend und geeignete Händewaschgelegenheiten mit Fußbedienung oder automatisch ausgelöstem Wasserfluß sowie Desinfektionsmöglichkeiten zur Verfügung stehen. Optimal wäre es, wenn in der Nähe des jeweiligen Arbeitsplatzes Desinfektionsspender

angebracht wären. Dies impliziert auch den Ersatz von konventionellen Handtüchern durch Papierhandtücher. Der Zugang zu den Sanitärräumen muß durch Desinfektionsmatten abgegrenzt werden. Durch Aufklärung muß den Beschäftigten die Notwendigkeit von Hygienemaßnahmen verdeutlicht werden. Mittels Keimgehaltskontrolle der Hände kann ihre Durchführung eindrucksvoll überwacht werden.

Mit dem Ziel, ökologische Nischen innerhalb der Betriebe aufzufinden, wurden die Produktionsanlagen und deren Umfeld auf das Vorhandensein von Listerien überprüft. In der Umgebung von Produktionsanlagen wurden Listerien in Kondenswasseransammlungen der Tropfwasserauffangwannen eines Deckenkühlaggregates, im Schlauchende eines Warmluftverteilerschlauches, an Wänden, Türen, an Abdeckfolien sowie in den Abflüssen nachgewiesen.

Auch andere Autoren, die Umgebungsuntersuchungen in Käsereien und anderen lebensmittelherstellenden Betrieben durchgeführt haben, weisen auf die Bedeutung der Bildung von Aerosolen und Kondensaten und die Problematik der Listerienansammlung in Abflüssen hin (U.S. FDA et al., 1987; COX, 1988; WILSON, 1988). In diesem Zusammenhang fordert die FDA im Verein mit Industrieverbänden (U.S. FDA et al., 1987), daß in kritischen Betriebsbereichen auf die Hochdruckreinigung zu verzichten ist, weil dabei Aerosole entstehen können, die zur Verteilung der Listerien im gesamten Betrieb führen können. Vor allem sollte von einer Hochdruckreinigung der Gullys Abstand genommen werden, da dieser ein Keimreservoir darstellt. Der Gully kann daher auch ein Indikator für die Anwesenheit von Listerien im Betrieb sein. Deshalb werden - neben Produkt- und Schmierwasserkontrollen - regelmäßige Untersuchungen von Gully-Inhalt im Rahmen der Sorgfaltspflicht empfohlen. Dabei ist jedoch essentiell, daß die Probennahme vor der Reinigung und Desinfektion erfolgt, um eine Störung des Listeriennachweises durch Desinfektionsmittel auszuschließen. Im Zusammenhang mit der Kondensatbildung weist COX (1988) darauf hin, daß Temperaturgradienten zu vermeiden sind. Dies kann z.B.

durch Einbau einer Deckenheizung, durch wasserdurchlässige Wandfarben und Absaugen des Reinigungswassers erfolgen. Auch Reinigungs- und Hilfsgerätschaften erwiesen sich als kontaminiert. So wurden auf dem Griff einer Hochdruckspritze, die zur täglichen Reinigung der Anlagen verwendet wurde, wiederholt Listerien nachgewiesen. An anderen Reinigungsgeräten, wie Holzbürsten und Schrubber, wurden die Keime ebenfalls gefunden.

Nicht nur das Umfeld der Produktionsanlagen, sondern auch diese selbst können Brutstätten für Listerien darstellen. KESSLER (1988) berichtet über Möglichkeiten der Rekontamination bei der Weichkäseherstellung unter dem besonderen Aspekt der Anlagenkonzeption. In Übereinstimmung mit ihm wurden zum Teil erhebliche Konstruktionsmängel festgestellt und in hygienischer Hinsicht bedenkliche Umbauten an den Portionier- und Formanlagen sowie insbesondere an den Schmiermaschinen beobachtet. Der Bruchverteilerkasten einer Portionieranlage wurde nach der Reinigung bis zur Wiederinbetriebnahme auf einem Halterahmen gelagert, der nicht in den täglichen Reinigungszyklus eingeschlossen war. In den Schweißnähten dieser Halterung konnten Listerien nachgewiesen werden. In diesem Fall stellte sich auch das gesamte Umfeld der Anlage (Schaltzentrale, Motorschutz, Blechverkleidung der Batterie, Messerhalterung für Schneidmesser) als kontaminiert heraus. In der Anlage selbst sowie in der abtropfenden Molke wurden ebenfalls Listerien gefunden. Nachdem nachträglich angebrachte Spritzschutzbleche entfernt und die Reinigung und Wartung der Anlage intensiviert wurden, sind in diesem Bereich der Käseerei keine Listerien mehr gefunden worden.

Die Misch- und Formanlagen in den Sauermilchkäsereien wiesen ebenfalls Schwachstellen auf (offene Quarkmischwannen, Holzabstreifer an der Quarkmühle, abgenutztes Förderband, Rückstandsansammlung im Rührwerk der Formanlage, feinste Risse in den Wannen).

An den Sprühmaschinen wurden überflüssige Anlageteile, wie Gebläse oder Spritzschutz entfernt, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen und eine Totraumbildung zu verhindern. Vor allem halbautomatische Schmiermaschinen erwiesen sich als unübersichtlich und unzugänglich. Bedingt durch viele Nischen und Rinnen war eine gründliche Reinigung häufig nicht oder nur durch sehr hohen Zeitaufwand möglich. Einige schadhafte Anlageteile waren durch selbst konstruierte Ersatzteile (Holzeinsätze) ausgetauscht worden, die nicht nahtlos in die Anlage eingepaßt werden konnten. In den entstehenden Spalten konnten sich Schmierrückstände ansammeln. Auch aufgerauhte Oberflächen der Förderbänder wurden beobachtet. Selbst nach der Reinigung, konnten in abgekratzten Rückständen von Holzoberflächen, sowie in Abstrichen vom Käseschieber und den Schmierbürsten Listerien nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß sich an den schlecht zugänglichen Stellen und rauen Oberflächen Käsepartikel ablagern können, die, weil eiweißreich, zur Herabsetzung der Desinfektionsmittelwirkung (Eiweißfehler) führen.

Risse, raue Oberflächen und ausgewaschene Rillen wurden auf vielen Reifungsbrettern beobachtet. Die Listerienfunde auch an gereinigten und desinfizierten Brettern sind ein Beweis dafür, daß eine üblicherweise in den Betrieben durchgeführte Reinigung nicht ausreicht, Listerien vollständig zu eliminieren. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, daß nur wenig Reinigungsmittel in die Poren eindringen kann (WIEDEMANN, 1988). Es stellt sich die Frage, ob eine intensivere Reinigung und Desinfektion überhaupt in der Lage ist, hier Abhilfe zu schaffen. Andererseits würde ein solches Vorgehen auch dazu führen, daß die betriebseigene Hausflora, die sich in diesen Rissen vermehrt, zerstört wird. Da Holz "mikrobiologisch praktisch nicht beherrschbar ist" (KESSLER, 1988) empfiehlt es sich, dieses Material weitest möglich aus dem Käserei- und Reifungsbereich zu entfernen und, wenn möglich, durch rostfreien Edelstahl zu ersetzen. Diese Umstellung ist allerdings sehr kostenintensiv, einerseits durch die hohen Anschaffungskosten (Edelstahlhorden), andererseits durch Änderungen im Produktionsablauf (Zukauf von Kulturen).

In Modellversuchen wurde geprüft, ob und wie lange Listerien in den hohen Kochsalzkonzentrationen überleben können, wie sie im Salzbad vorliegen. Dabei konnte in Übereinstimmung mit anderen Autoren (STENBERG, 1961; SHAHAMAT et al., 1980) eine hohe Kochsalztoleranz der Listerien festgestellt werden. Die lange Überlebensdauer von bis zu zwölf Tagen bei 18 bis 20°C in 20- bis 25%iger Salzlösung weist darauf hin, wie wichtig es ist, auch das Salzbad in die Listerienprophylaxe einzubeziehen. Keinesfalls darf, wie es hin und wieder beobachtet werden konnte, das Salzbad dazu benutzt werden, auf den Fußboden gefallene Käse darin abzuwaschen. Daß die im Labormaßstab ermittelten Ergebnisse auch auf die Käsereipraxis übertragbar sind, belegt der wiederholte Listeriennachweis im Salzbad eines Betriebes. Die Untersuchungen von SHAHAMAT et al. (1980) zeigten, daß die Kochsalzresistenz mit steigender Temperatur abnimmt. So konnten die Autoren in Trypticase soy broth mit 20,5% Kochsalzzusatz die Keime bei 37°C nur fünf Tage, bei 22°C dagegen 28 Tage lang nachweisen. Ein regelmäßiges Erhitzen der Salzbadflüssigkeit bietet sich deshalb an, um eventuell vorhandene Listerien abzutöten. In diesem Zusammenhang ist auch auf die Bedeutung der Kondensatbildung an den Decken hinzuweisen. Wie in eigenen Untersuchungen und auch von anderen Autoren (COX 1988; WILSON, 1988) beobachtet wurde, können sich Listerien in Kondensaten halten und durch Abtropfen ins Salzbad gelangen.

In einem weiteren Modellversuch wurde im Hinblick auf die Salz- und Säureempfindlichkeit der Listerien Fetakäse vor dem Überschichten mit milchsäurehaltiger Salzlake an der Oberfläche mit Listerien kontaminiert, mit dem Ergebnis, daß selbst bei niedrigen pH-Werten hohe Salzkonzentrationen über einen langen Zeitraum toleriert werden. PAPAGEORGHIU und MARTH (1988) kontaminierten die Kesselmilch bei der Fetaproduktion mit *L. monocytogenes* und wiesen die Keime noch nach 60 Tagen nach. *L. monocytogenes* kann demnach in Salzlake gereiftem Fetakäse die übliche Reifungsdauer (über 1 Monat) überleben. Allerdings ist es unvorstellbar, daß bei Fetakäse in der kurzen Zeit zwischen Bruchbereitung und Einlegen des Käses in

die Lake wesentliche Kontaminationen und darüber hinaus eine nennenswerte Vermehrung der Listerien zu erwarten sind. Sollte jedoch ein Risiko zu erwarten sein, müssen Fetakäse Hersteller alles tun, um eine Kontamination und Vermehrung zu verhindern.

Anhand weiterer Modellversuche wurde dargestellt, wie sich Listerien während der Herstellung, Reifung und Lagerung von Romadur- und Schnittkäse verhalten. Übereinstimmend mit anderen Autoren (TERPLAN et al., 1986; DOMINGUEZ et al., 1987; RYSER und MARTH, 1987a) zeigte sich, daß auch bei der Herstellung von Romadur- und Edamerkäse aus listerienhaltiger Kesselmilch eine Konzentrierung der Keime im Käsebruch stattfindet. DOMINGUEZ et al. (1987) erklären dies damit, daß die Keime an das Kasein gebunden oder davon eingeschlossen im Bruch zurückgehalten werden. Mit zunehmender Säuerung war eine Abnahme der Listerienzahl festzustellen. Um möglicherweise geschädigte Keime mitzuerfassen, wurden der Käsebruch und der frische Käse sechs bis zwölf Stunden vorangereichert. Bei der Produktion von Edamerkäse verdoppelte sich die Keimzahl innerhalb von 48 Stunden nach der Herstellung, erreichte nach 14 Tagen ihren Höhepunkt (11000 CFU/g) und nahm nach 35 Tagen wieder ab. Dabei waren nur geringe Keimzahlunterschiede zwischen Käseoberfläche und dem Inneren festzustellen. Dies ist auf die gleichen Wachstumsbedingungen im ganzen Käse zurückzuführen. Dafür sprechen die nahezu identischen a_w - und pH-Werte. Die Keime konnten noch 105 Tage nach der Herstellung nachgewiesen werden. Bei der Herstellung von Cheddarkäse aus mit *L. monocytogenes* kontaminierter Kesselmilch konnten RYSER und MARTH (1987b) ähnliche Beobachtungen machen. Dies verdeutlicht, daß auch Schnittkäse herstellende Betriebe sich der Probleme, die von einer *L. monocytogenes*-Kontamination ausgehen können, bewußt sein müssen. Die Ergebnisse der Keimdynamikanalyse sprechen dafür, daß ein Listeriennachweis in Schnittkäse am besten zwischen der zweiten und fünften Reifungswoche erfolgen sollte. Eine rechtzeitige Produktkontrolle wäre demnach möglich, bevor die Ware in den Handel gelangt.

Die Keimdynamik bei der Reifung von Rotschmierekäse zeigte einen anderen Verlauf. Die ersten zwei Wochen nach der Käseherstellung aus kontaminierter Kesselmilch waren in der Käsoberfläche (10 g) praktisch keine Listerien nachweisbar. Ab dem 13. Tag nach der Herstellung war ein stetiger Anstieg der Keimzahl an der Oberfläche zu verzeichnen. Zu diesem Zeitpunkt hatte der pH-Wert bereits den Neutralpunkt erreicht. Dies spricht dafür, daß die Keime durch die Säure in ihrer Vermehrung gehemmt wurden. 28 Tage nach der Herstellung wurden 4500 Keime pro Gramm Käse gefunden. Auf eine längere Untersuchungsdauer wurde verzichtet, da Rotschmierekäse üblicherweise etwa vier Wochen nach der Herstellung verzehrt werden. TERPLAN et al. (1986) zeigten jedoch, daß bei längerer Lagerung (bis zu drei Monaten) die Listerienzahl an der Oberfläche noch weiter zunimmt. Auch RYSER und MARTH (1987b) machten ähnliche Beobachtungen bei aus kontaminierter Kesselmilch hergestellten Camembertkäsen. Sie wiesen in diesem Zusammenhang auf die Bedeutung einer gezielten Probenentnahme vor allem von der Käsoberfläche zum richtigen Zeitpunkt (frühestens 25 Tage nach der Herstellung) hin. Auch bei Rotschmierekäse sollte gezielt die Oberfläche von gereiftem Käse untersucht werden (TERPLAN et al., 1986).

Da Kamhefen bei der Reifung von Rotschmierekäse eine wichtige Rolle bei der Entsäuerung der Käsoberfläche spielen und zugleich Wachstumsfaktoren für Rotschmierebakterien bilden (KAMMERLEHNER, 1986), wurde überprüft, ob eine Behandlung mit Mycoderma-Hefen die Listerienvermehrung an der Oberfläche von kontaminiertem Romadurkäse beeinflußt. Unabhängig vom Kontaminationsmodus konnte etwa zwei Wochen lang kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Mycoderma-Hefen behandelten Käsen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Ab der dritten Woche wurden in mit Hefen behandelten Käsen, hergestellt aus kontaminierter Kesselmilch, etwa um den Faktor 100 mehr Listerien nachgewiesen als in Kontrollkäsen. Dies könnte aus dem Schmiermodus resultieren, da stets zuerst die Kontrollgruppe, dann die Käse mit Hefebehandlung in der Schmierlösung gewendet wurden. Somit kann eine Listerienübertragung mit der

Schmierlösung stattgefunden haben. Möglicherweise stimulieren Hefen durch Stoffwechselprodukte aber auch das Wachstum der Listerien. Insgesamt gesehen sollten aufgrund dieser orientierenden Versuche keine Schlußfolgerungen gezogen werden.

Da Rotschmierekäse zum Wachstum der Oberflächenflora eine Temperatur von 15 bis 17°C und eine hohe Luftfeuchtigkeit während der Reifung benötigt, sind für Listerien günstige Wachstumsbedingungen gegeben. Die Hersteller versuchen, ein schnelleres Anwachsen der Oberflächenflora zu erzielen, wodurch die Kontaminationsgefahr durch schädliche Keime vermindert und die Reifungsdauer etwas verkürzt werden kann. In der Praxis der Rotschmierekäserei versucht man hierzu die Oberflächenflora der älteren Käse auf die jüngeren zu überimpfen, indem immer zunächst die älteren und dann die jüngeren Käse geschmiert werden. Dadurch kann bei Anwesenheit von Listerien ein Kontaminationskreislauf initiiert werden. Eine Umkehr des Schmierzyklus wäre einerseits wünschenswert, um die Kontamination junger Käse zu verhindern. Andererseits führt dies jedoch zu erheblichen Problemen bei der Produktion (längere Reifungsdauer, stärkere Schimmelbildung, Geschmackseinbußen, Schmierefehler). Kulturenzukauf verteuert zudem die Produktion.

In den Sauermilchkäsereien werden, um eine schnelle Oberflächenreifung zu erzielen, der Käserohmasse sogenannte Kulturrenkäse untergemischt. Dazu dienen Käsereste der vorangegangenen Tage bzw. eigens dafür produzierte Käse mit großer Oberfläche und damit hohem Anteil an Oberflächenflora. Sind diese "Starter" durch Listerien kontaminiert, entsteht ein ähnlicher, schwer zu unterbrechender Kreislauf, wie vorher für die Rotschmierekäsereien beschrieben.

In den Sauermilchkäsereien dienen zugekaufter Sauermilchquark und bei Exportware auch Kaseinat als Ausgangsstoff für die Käseherstellung. In Sauermilchquarkproben verschiedener Hersteller und in einer Kaseinatmischprobe konnten in eigenen Untersuchungen Listerien nachgewiesen werden. BUSSE (1988) bestätigt Listerienfunde in Sauermilchquark. In neuseeländi-

schem Kaseinat konnte nach in mündlichen Gesprächen vermittelten Informationen L. monocytogenes nachgewiesen werden. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Feststellung, daß in eigenen Untersuchungen positive Befunde in Sauermilchquark erst nach gezielter Probennahme (entsäuerte Randschichten) und Voranreicherung möglich waren. Wurden hingegen Durchschnittsproben untersucht, konnten trotz Voranreicherung keine Listerien nachgewiesen werden. Ob diese Ergebnisse auf eine subletale Schädigung der Keime bei nicht ausreichender Voranreicherungsdauer oder auf eine ungleichmäßige Verteilung der Listerien in den Quarksäcken zurückzuführen sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Weitere Forschungsarbeiten zur Verbesserung des Listeriennachweises sind erforderlich, vor allem im Hinblick auf wünschenswerte Statusuntersuchungen und regelmäßige Produktkontrollen. Da in 15% der untersuchten Quarkproben Listerien gefunden wurden, sind die Sauermilchquarkhersteller als Zulieferer der Käse-reien ebenfalls aufgefordert, ihrer Sorgfaltspflicht nachzukommen und sich an Statusuntersuchungen und Maßnahmen zur Prophylaxe zu beteiligen.

Ziel weiterer Untersuchungen war es, verschiedene Nachweisverfahren auf ihre Eignung in der Routine-Listeria-Diagnostik für Milch, Milchprodukte und Umfelduntersuchungen in Käse-reien zu prüfen.

In Vorversuchen wurde die Effektivität von drei selektiven Anreicherungsmedien (EB, LEB, LAB) anhand der Vermehrungsfähigkeit von zwei L. monocytogenes-Referenzstämmen (Sv. 1/2a und Sv.4b) geprüft. Dabei zeigte sich, daß in der EB die höchsten, in der LAB hingegen die geringsten Keimzahlen erreicht wurden. Dieses Ergebnis wurde im Modellversuch eines künstlich kontaminierten Käses bestätigt.

Es liegt nahe, die unterschiedliche Effektivität der Anreicherungsmedien darauf zurückzuführen, daß die zugesetzten Selektivstoffe nicht nur das Wachstum der störenden Begleitflora hemmen, sondern auch die Vermehrung der Listerien einschränken.

Acriflavin, ein Selektivstoff zur Unterdrückung grampositiver Begleitflora, ist Bestandteil aller drei Anreicherungsmedien, wobei die EB die höchste Konzentration enthält. Ein Vergleich von LEB und EB zeigt, daß der Nalidixinsäuregehalt der beiden Medien identisch ist. Die geringere Effektivität der LEB könnte durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Basisnährböden gegeben sein. Auch SWAMINATHAN et al. (1988) kamen zu vergleichbaren Ergebnissen und vermuten, daß der höhere NaCl-Gehalt und/oder die Kohlenhydratquelle (Äsculin) dafür ursächlich sind. Der Acriflavingehalt der Unteranreicherung der LEB (25 mg/l) dürfte auf jeden Fall zu hoch sein (siehe STEINMEYER, 1988).

Zur Hemmung der gramnegativen Begleitflora ist in der LAB - als wesentlicher Unterschied zur EB - die Nalidixinsäure durch Kaliumthiocyanat ersetzt, worauf möglicherweise die schlechtere Effektivität zurückzuführen ist.

Mit dem Ziel, die Nachweisrate für Listerien in der Routine zu verbessern, wurden in weiteren orientierenden Versuchen drei selektive Isolierungsmedien (ACA, LSA, LPMA) mit dem bisher in der Routineuntersuchung von Milch und Milchprodukten eingesetzten MMA verglichen.

In 62 von 142 ausgewählten Proben wurden Listerien nachgewiesen, wobei mit dem LPMA 98%, mit dem ACA 82%, mit dem MMA 81% und mit dem LSA nur 55% als positiv erkannt wurden. Der LPMA, der sich hinsichtlich der Nachweisrate am geeignetsten erwies, war auch deutlich selektiver. Es war zu beobachten, daß auf den anderen Nährböden sehr viel mehr Begleitflora wuchs. Die Auswertung und die Isolierung verdächtiger Kolonien wurden dadurch erheblich erschwert.

Daher wurde für die weiteren Untersuchungen der LPMA gewählt und mit dem MMA verglichen. Als Untersuchungsmaterial dienten neben Käse auch Proben aus Stufenkontrollen und Umgebungsuntersuchungen in Käsereien (Bruch-Molke-Gemisch, Salzbad, Schmierflüssigkeit, Abstriche, Gully-Inhalt, Zusatzstoffe), wobei der Anteil von Proben aus Problembetrieben etwa 40%

betrug. Daher können die Ergebnisse nicht als repräsentativer Querschnitt für das Vorkommen von Listerien in Käsereien angesehen werden. Von insgesamt 892 untersuchten Proben erwiesen sich 276 (31%) als Listeria-positiv, wobei 99% mit dem LPMA und 85% mit dem MMA erkannt wurden. Bei manchen Probenarten (z.B. Gully-Inhalt, Sauermilchkäse) war der Unterschied zwischen LPMA und MMA noch stärker ausgeprägt. Dies ist wahrscheinlich auf die höhere Selektivität des LPMA gegenüber Keimen, die sich im Anreicherungsmedium trotz vorhandener Selektivstoffe vermehren können, zurückzuführen. Wegen dieser hohen Selektivität eignet sich der LPMA besonders zur Untersuchung von Lebensmitteln mit starkem Keimwachstum, wie z.B. Fleisch (LEE und McCLAIN, 1986).

Ein Vergleich der Effektivität der beiden Nährböden in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt ergab, daß der LPMA auch wesentlich früher zu positiven Werten führte. Daß auch beim Einsatz des LPMA immer noch 13% der positiven Proben erst nach 7 d Anreicherung erkannt wurden, spricht für die Empfehlung, daß bei Status- und Umfelduntersuchungen nicht auf diese längere Anreicherungszeit verzichtet werden sollte. Ob mit einer drei- oder viertägigen Anreicherung bereits gleiche Ergebnisse erreicht werden können wie nach sieben Tagen (BUSSE, 1988), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft werden.

Bei einem Vergleich des Ausstriches der Unteranreicherung mit dem der Hauptanreicherung konnte kein wesentlicher Vorteil der Unteranreicherung festgestellt werden. McCLAIN und LEE (1988) hingegen fanden bei der Untersuchung von Fleisch und Fleischwaren in der Unteranreicherung etwa 42% mehr positive Proben als in der Hauptanreicherung. Bemerkenswert ist jedoch die Feststellung, daß ohne Ausstreichen der Hauptanreicherung etwa 13% der positiven Proben nicht erkannt worden wären. Es spricht einiges dafür, daß die Art und der Zustand einer Probe eine große Rolle spielt.

In eigenen Untersuchungen wurde beobachtet, daß einzelne durch Einsatz des MMA isolierte L. seeligeri-Stämme auf dem

LPMA in ihrem Wachstum gehemmt wurden, nicht jedoch die L. monocytogenes-Isolate. Andere Autoren dagegen berichten, daß dies auch vereinzelt bei L. monocytogenes-Stämmen der Fall sein kann. So fanden SWAMINATHAN et al. (1988) drei Stämme, die auf dem LPMA erst nach 96 Stunden als kleine Kolonien erkennbar waren. Es gibt Hinweise dafür, daß dies auf eine Vorschädigung, z.B. durch Hitze, zurückzuführen ist (BUCHANAN et al., 1988).

Die größere Selektivität und die höhere Nachweisrate sprechen für den Einsatz des LPMA in der Routine-Diagnostik. Die Feststellung, daß vorgeschädigte L. monocytogenes-Stämme möglicherweise nicht oder zu spät auf diesem Isolierungsmedium erkennbar sind, zeigt, daß die parallele Verwendung zweier fester Selektivnährböden analog der Salmonella-Diagnostik von Vorteil sein kann. Auch die FDA (DEPARTEMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1988) hat vor Kurzem ihre Nachweismethode modifiziert und verlangt den parallelen Einsatz von LPMA und MMA, wobei auf den KOH-Verdünnungsausstrich verzichtet und die Anreicherungszeit auf zwei Tage reduziert wird. Auch in eigenen Untersuchungen erwies sich der KOH-Verdünnungsausstrich als nicht effektiv. Auf eine Unteranreicherung wird auch in der neuen Fassung der FDA-Methode verzichtet.

Die Suche nach geeigneten und schnellen Verfahren ist noch lange nicht beendet. In einem Ringversuch wurden kürzlich mehrere Isolierungsmedien (MMA, LPMA, TNSA, Oxford-Medium) vergleichend geprüft. Dabei erwies sich das Oxford-Medium ähnlich selektiv wie der LPMA (TERPLAN, 1988c). Eine wesentliche Verbesserung des Nachweises kann erwartet werden, wenn bereits im Anreicherungsmedium Listerien erkannt werden können. In dieser Hinsicht gibt es Ansätze für effektive Verfahren (Enzymimmunologische Testverfahren (ELISA), DNA-Hybridisierung).

Die Listeriose ist eine seltene Erkrankung (3 bis 10 Fälle/1 Million Einwohner/Jahr). Wichtig für die Beurteilung ist jedoch, daß etwa 30% der Fälle tödlich verlaufen. Als Risikogruppen gelten Schwangere, Un- und neugeborene Kinder, sowie immungeschwächte Personen. Da die Faktoren, die zu einer Listerienerkrankung führen können, noch nicht hinreichend bekannt sind, kann den Risikogruppen vorerst nur geraten werden, Nahrungsmittel, bei denen mit einem Vorkommen von *L. monocytogenes* gerechnet werden kann, nur nach bestimmten Vorkehrungen zu verzehren (z.B. Erhitzen von Fleisch; Entfernen der Oberfläche von Weichkäsen). Weltweite Untersuchungen haben gezeigt, daß andere Lebensmittel wesentlich stärker mit *L. monocytogenes* kontaminiert sind als Milch und Milchprodukte (WEISE, 1987; ERDLE, 1988; BREER, 1988; BREUER und PRÄNDL, 1988, TERPLAN, 1988a). Angesichts der weiten Verbreitung von Listerien, ohne daß Zusammenhänge mit Erkrankungen deutlich geworden sind, stellt sich die Frage, ob die Forderung nach *L. monocytogenes*-freien Lebensmitteln erfüllt werden kann (TERPLAN, 1988c; WHO, 1988).

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen zum Vorkommen und Nachweis von Listerien in Käsereien. Im ersten Teil der Arbeit wurden Einschleppungs- und Vermehrungsmöglichkeiten in Rotschmiere-, Sauermilch- und Schnittkäse herstellenden Betrieben untersucht. In den Käsereien wurden ökologische Nischen aufgezeigt, in denen sich Listerien aufgrund ihres oligotrophen und psychrotrophen Verhaltens und ihrer Toleranz gegenüber Salz und Säure halten bzw. vermehren können. Solche Brutstätten fanden sich sowohl im Umfeld der Produktionsanlagen (Kondensate, Hilfsgerätschaften, Gully-Inhalt) als auch in den Anlagen selbst (Quarkmisch- und Portionieranlage, Schmiermaschinen).

Es wurden Hinweise dafür gefunden, daß der Mensch als Überträger, aber auch als Kontaminationsquelle eine bedeutende Rolle einnimmt. Durch Stuhlprobenuntersuchungen von Beschäftigten wurde festgestellt, daß auch klinisch gesunde Menschen vorübergehend Listerien ausscheiden können. Diese Ergebnisse, wie auch Listerienfunde an Gerätschafts- und Anlageteilen, mit denen die Beschäftigten manuellen Kontakt hatten, machen deutlich, wie wichtig eine ordnungsgemäße Durchführung und Überwachung der Personalhygiene ist.

Im Hinblick auf die Wirkung des Kochsalzes auf Listerien und im Salzbad wurde in Modellversuchen geprüft, ob und wie lange Listerien hohe Salzkonzentrationen tolerieren. Da die Keime zwölf Tage lang in einer 25%igen Kochsalzlösung gefunden werden konnten, muß auch das Salzbad in die Listerienprophylaxe einbezogen werden.

Auch in Fetakäse, dessen Oberfläche vor dem Einbringen in die Salzlake mit Listerien künstlich kontaminiert wurde, konnten die Keime 50 Tage lang nachgewiesen werden.

An Edamkäse, hergestellt aus künstlich kontaminierter Kesselmilch, wurde gezeigt, daß ein Listeriennachweis zwischen der zweiten und der fünften Reifungswoche am besten möglich ist. Eine Produktkontrolle kann demnach erfolgen, bevor die Ware in den Handel gelangt.

In weiteren Modellversuchen wurden Rotschmierekäse zum einen aus kontaminierter Kesselmilch hergestellt, zum anderen eine Rekontamination durch den Schmiervorgang simuliert. Die Keimdynamikstudie der Listerien ergab, daß eine Vermehrung erst einsetzt, wenn eine Entsäuerung der Oberfläche stattgefunden hat. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß ein Listeriennachweis vor diesem Zeitpunkt (zwölf Tage nach der Herstellung) wenig erfolgversprechend ist. Eine Behandlung der Oberfläche mit Mycoderma-Hefen führte nicht zu einer Hemmung des Listerienwachstums.

Mit dem Ziel, die Routine-Diagnostik im Hinblick auf möglichst frühzeitig vorliegende Ergebnisse bei Produktions- und Produktkontrollen zu verbessern und zu beschleunigen, wurden mehrere Nachweisverfahren und Isolierungsmedien getestet. Das Anreicherungsmedium der FDA (EB) erwies sich in Vorversuchen gegenüber der Listeria-Anreicherungsbouillon (LAB) und dem Anreicherungsmedium der USDA-Methode (LEB) als geeigneter. Da der LiCl-Phenylethanol-Moxalactam-Agar (LPMA) durch eine höhere Nachweisrate und eine größere Selektivität dem Acriflavin-Ceftazidim-Agar (ACA) und dem Listeria-Selektiv-Agar (LSA) deutlich überlegen war, wurde dieses Isolierungsmedium mit dem bisher in der Routine eingesetzten modifizierten McBride-Agar (MMA) verglichen. Hierzu wurden 892 Proben (Handelsproben und Proben aus Status- und Umgebungsuntersuchungen) in EB angereichert. Die Hauptanreicherung wurde nach 48h und 7 d, die Unteranreicherung nach 24 h Bebrütung bei 30°C auf dem LPMA und dem MMA ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte nach 24 h und 48 h mit Hilfe der Beleuchtung nach HENRY. Dabei erwiesen sich 31% der Proben als listerienhaltig, wobei es sich bei 5% der Proben um *L. monocytogenes*, in 26% um andere Listeria-Spezies handelte. Da etwa 40% der Proben aus Problembetrieben stammten, kann dieses Ergebnis nicht als repräsentativer Querschnitt für das Vorkommen von Listerien in deutschen Käsereien gelten.

Der LPMA erbrachte gegenüber dem MMA 14% mehr positive Befunde, wobei mit dem LPMA 13% und mit dem MMA 29% erst am siebten Tag erkannt wurden.

Summary

Incidence and detection of *Listeria* in cheese factories

This paper describes investigations about the incidence and detection of *Listeria* in cheese factories. First the possibilities of invasion and growth in factories producing red smear, acid curd and semi-hard cheese, respectively, were explored.

In these factories environments are monitored in which *Listeria* may survive and grow because of their oligotrophic and psychrotrophic behaviour as well as of their tenacity against salt and acid. *Listeria* could be detected in processing areas (condensate, auxiliary utensiles, floor drains) and on production equipments.

Some indications were found that man can act as a transmitter as well as a source of contamination. The examinations of fecal samples of workers showed that even clinically healthy persons can temporarily excrete *Listeria*. Regarding these results and the presence of *Listeria* on the surfaces of such equipments which can have a manual contact to stuff members elucidate the importance of personel hygiene.

Since *Listeria* could be detected in the brine bath the tolerance against high concentrations of NaCl were investigated. The bacteria could be isolated after 12 d in 25% NaCl solution, indicating that in the monitoring system the brine bath must be included with regard to the salt tolerance of *Listeria*. *Listeria* could also be isolated from Feta cheese 50 d after artificial contamination of the surface.

The examination of Edam cheese produced from artificially contaminated cheese milk yielded the best results of detection between the 2nd and 5th week of ripening, indicating that the safety of this product can be ascertained before leaving the plant.

In further experiments with red smear cheese the contamination with *Listeria* was brought about by producing cheese from contaminated cheese milk and by the contamination of smearing

water, respectively. The examinations showed that growth could not be detected before the deacidification of the surface. Isolation of *Listeria* may not be successful before this time (12 d after production). Treatment of the surface with *Mycoderma* cultures did not have any inhibitory effect on growth of *Listeria*.

In order to improve and to accelerate the routine procedures for the detection of *Listeria* some methods and media were tested. In preliminary tests the FDA enrichment broth (EB) was superior to *Listeria* enrichment broth (LAB) and the enrichment broth of the USDA-method (LEB), respectively.

LiCl-phenylethanol-moxalactam-agar (LPMA) was more suitable with regard to detection and selectivity than acriflavine-ceftadizidime-agar (ACA) and *Listeria*-selective-agar (LSA). Therefore in further examinations the LPMA was compared with the usual modified McBride agar (MMA). 892 samples (trade products, samples sent from cheese factories) were incubated in EB. After 48 h and 7 d the primary enrichment cultures were streaked onto surface of LPMA and MMA. Material from the secondary enrichment was inoculated after 24 h (30°C) on MMA and LPMA. From these isolation media which were examined after 24 and 48 h (37°C) for suspect colonies with the illumination of HENRY, *Listeria* were found in 31% of the samples; namely 5% of the samples contained *L. monocytogenes* and 26% other *Listeria* species. These results are not representative for the incidence of *Listeria* in German cheese factories because a considerable part of samples (about 40%) originated from plants which had problems with these organisms. Using LPMA 14% more positive results were obtained than on MMA. 13% (using LPMA) and 29% (using MMA) of the positive samples proved to be contaminated with *Listeria* only after a 7 day enrichment procedure.

6. Literaturverzeichnis

AMTSBERG, G. (1980):

Listerien.

In: BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. II, S. 345-438.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

ARCHER, D.L. (1988):

Review of the latest FDA information on the presence of *Listeria* in foods.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva)

BANNERMAN, E.S. und J. BILLE (1988):

A new selective medium for isolating *Listeria* spp. from heavily contaminated material.

Appl. Environ. Microbiol. 54, 165-167

BEARNS, R.E. und K.F. GIRARD (1959):

On the isolation of *Listeria monocytogenes* from biological specimens.

Am. J. Med. Tech. 25, 120-126

BERGER U. und U. PIETSCH (1975):

Untersuchungen zur Häufigkeit der Listerien-Keimträger.

Med. Microbiol. Immunol. 161, 63-71

BIESTER, H.E. und L.H. SCHWARTE (1939):

Studies on *Listerella* infection in sheep.

J. Infect. Dis. 64, 135-144

BILLE, J. und M.-P. GLAUSER (1988):

Zur Listeriose-Situation in der Schweiz.

Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen (Schweiz), Nr.3

BIND, J.-L. (1988):

Review of latest information concerning data about repartition of *Listeria* in France.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva)

BRANDL, E. (1988):

Gesundheits- und betriebshygienische Aspekte des Vorkommens von *Listerien* in Lebensmitteln.

Molkerei-Ztg. "Welt der Milch", 42, 697-700

BREER, C. (1987):

Das Vorkommen von *Listerien* in Käse.

In: Listeriosis; Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West) 1986, Institut f. Veterinärmedizin d. BGA, Vet. med. Hefte 5/1987

Derselbe (1988):

Occurrence of *Listeria* spp. in different foods.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva)

BREUER, J. und O. PRÄNDL (1988):

Nachweis von *Listerien* und deren Vorkommen in Hackfleisch und Mettwürsten in Österreich.

Arch. Lebensmittelhyg. 39, 28-30

BUCHANAN, R.L., J.L. SMITH, H.G. STAHL und D.L. ARCHER (1988):

Listeria methods development research at the Eastern Regional Research Center, U.S. Departement of Agriculture.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 651-654

BUSSE, M. (1988):

Persönliche Mitteilung

CHRISTIE, R., N.E. ATKINS und E. MUNCH-PETERSEN (1944):

A note on a lytic phenomenon shown by group B Streptococci.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 22, 197-200

CONNER, D.E., R.E. BRACKETT und L.R. BEUCHAT (1986):

Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of
Listeria monocytogenes in cabbage juice.

Appl. Environ. Microbiol. 52, 59-63

COX, L.J. (1988):

Prevention of foodborne listeriosis - the role of the food
processing industry.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on
Foodborne Listeriosis, Geneva)

CURTIS, G.D.W., R.G. MITCHELL, A.F. KING, E.J. GRIFFIN (1989):

A selective differential medium for the isolation of *Listeria*
monocytogenes.

Let. Appl. Microbiol. 8, 95-98

DEPARTEMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, FOOD AND DRUG ADMI-
NISTRATION (1988):

Bacteriological analytical manual, chapter 29 - *Listeria*
isolation; revised method of analysis.

Federal Register 53, 44148-44153

DEUTSCHER RAIFFEISENVERBAND, MILCHINDUSTRIE-VERBAND und
BUNDESVERBAND DER PRIVATEN MILCHWIRTSCHAFT (1987):

Listerien - Zur Sorgfaltspflicht bei der Herstellung von
Weichkäse und halbfestem Schnittkäse.

Molkerei-Ztg. "Welt der Milch", 51/52, 1595-1596

DIJKSTRA, R.G. (1975):

Recent experiences on the survival times of *Listeria* bacteria
in suspensions of brain, tissue, silage, faeces and in milk.

6th International Symposium on Listeriosis, Leicester Univer-
sity Press Nottingham 1974, Proc., 71-74

DOMINGUEZ, L., J.F.F. GARAYZABAL, J.A. VAZQUEZ, J.L. BLANCO und G. SUAREZ (1987):

Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese.

Let. Appl. Microbiol. 4, 125-127

DONKER- VOET, J. (1972):

Listeria monocytogenes: some biochemical and serological aspects.

Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 19, 287-291

DONNELLY, C.W. und G.J. BAIGENT (1986):

Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk.

Appl. Environ. Microbiol. 52, 689-695

DONNELLY, C.W. und E.H. BRIGGS (1986):

Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition.

J. Food Prot. 49, 994-998

DOYLE, M.P. und J.L. SCHOENI (1986):

Selective-enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens.

Appl. Environ. Microbiol. 51, 1127-1129

Dieselben (1987):

Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface-ripened cheese.

J. Food Prot. 50, 4-6

ERDLE, E. (1988):

Zum Vorkommen von *Listerien* in Käse, Fleisch und Fleischwaren.

Diss. med. vet., München

FENLON, D.R. (1985):

Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment.

J. Appl. Bact. 59, 537-543

FLEMING, D.W., S.L. COCHI, K.L. McDONALD, J. BRONDUM, P.S. HAYES, B.D. PLIKAYTIS, M.B. HOLMES, A. AUDURIER, C.V. BROOME und A.L. REINGOLD (1985):

Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis.

N. Engl. J. Med. 312, 404-407

FRASER, J.A. und W.H. SPERBER (1988):

Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis.

J. Food Prot. 51, 762-765

GASPAROVIC, E. (1988):

Untersuchungen über das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch in Südwürttemberg.

Diss. med. vet., München

GEORGE, S.M., B.M. LUND und T.F. BROCKLEHURST (1988):

The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*.

Let. Appl. Microbiol. 6, 153-156

GEUENICH, H.-H. und H.E. MÜLLER (1984):

Isolierung und Keimzahlbestimmung von *Listeria monocytogenes* in ungeklärtem und biologisch gereinigtem Abwasser.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 179, 266-273

GRAY, M.L. (1957):

A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 169, 373-377

Derselbe (1960):

Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage.

Science 132, 1767-1768

GRAY, M.L. und A.H. KILLINGER (1966):

Listeria monocytogenes and listeric infections.

Bacteriol. Rev. 30, 309-382.

GRAY, M.L., H.J. STAFSETH, F. THORP, L.B. SCHOLL und W.F. RILEY (1948):

A new technique for isolating *Listerellae* from the bovine brain.

J. Bacteriol. 55, 471-476

GRØNSTØL, H. (1980):

zit. nach SKOVGAARD, N. (1987):

Listeria: Major sources and routes of human infection; environment and plants.

In: *Listeriosis*; Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West) 1986, Institut f. Veterinärmedizin d. BGA, Vet. med. Hefte 5/1987, 86-97

GROVES, R.D. und H.J. WELSHIMER (1977):

Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions.

J. Clin. Microbiol. 5, 559-563

HAO, D.Y.-Y., L.R. BEUCHAT und R.E. BRACKETT (1987):

Comparison of media and methods for detecting and enumerating *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage.

Appl. Environ. Microbiol. 53, 955-957

HENRY, B. S. (1933):

Dissociation of the genus *Brucella*.

J. Infect. Dis. 52, 374-402

HIRD, D.W. (1987):

Review of evidence for zoonotic listeriosis.

J. Food Prot., 50, 429-433

HO, J.L., K.N. SHANDS, G. FRIEDLAND, P. ECKIND und D.W. FRASER (1986):

An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals.

Arch. Intern. Med. 146, 520-524

HOF, H., H.P.R. SEELIGER, A. SCHRETTENBRUNNER und S. CHATZIPANAGIOTOU (1986):

The role of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in foodborne infections.

2nd. World Congress Foodborne Infections and Intoxication, Berlin (West), Vol. 1, 220-223

HOPPER, P.F. (1988):

Recent development in the detection and control of *Listeria monocytogenes*.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva)

HUNTER, R. (1973):

Observation on *Listeria monocytogenes* type 5 (Iwanow) isolated in New Zealand.

Med. Lab. Technol. 30, 51-56

JOHNSTON, M.A., A. LOIT, U. PURVIS und J. FARBER (1986):

Surveillance of soft and semi-soft cheese for *Listeria*.

73rd Annual Meeting IAMFES, Minneapolis

KAMMERLEHNER, J. (1986):

Labkäse-Technologie, Band I.

Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, S. 85-88

KAMPELMACHER, E.H. und L.M. VAN NOORLE-JANSEN (1969):

Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 211, 353-359

Dieselben (1972):

Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals .

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 70-77

KAMPELMACHER, E.H., W.T. HUYSINGA und L.M. VAN NOORLE-JANSEN (1972):

The presence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women and neonates.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222, 258-262

KAMPELMACHER, E.H., D.E. MAAS und L.M. VAN NOORLE-JANSEN (1976):

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women with and without direct animal contact.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 234, 238-242

KESSLER, W. (1988):

Möglichkeiten der Rekontamination bei der Weichkäseherstellung.

DMZ, 27, 826-832

KLINGER, J.D., A. JOHNSON, D. CROAN, P. FLYNN, K. WHIPPY, M. KIMBALL, J. LAWRIE und M. CURIALE (1988):

Comparative studies of nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 669-673

LARSEN, H.E. und H.P.R. SEELIGER (1966):

A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n..

3rd International Symposium on Listeriosis, Bilthoven, Proc., 35-39

LEE, W.H. und D. McCLAIN (1986):

Improved *Listeria monocytogenes* selective agar.

Appl. Environ. Microbiol. 52, 1215-1217

LEHNERT, C. (1960):

Die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in der Außenwelt.

Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 180, 350-356.

Derselbe (1964):

Bakteriologische, serologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Epizootologie und Prophylaxe der Listeriose.

Arch. Exp. Vet. Med., 18, 981-1027

LOVETT, J., D.W. FRANCIS und J.M. HUNT (1987):

Listeria monocytogenes in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity.

J. Food Prot. 50, 188-192

MATTINGLY, J.A., B.T. BUTMAN, M.C. PLANK, R.J. DURHAM und B.J. ROBINSON (1988):

Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 679-681

MAUTNER, A. (1988):

Konkrete Maßnahmen im Betrieb - Erfahrungen aus der Praxis.

DMZ 105, 151-152

McCLAIN, D. und W.H. LEE (1987):

A method to recover *Listeria monocytogenes* from meats.

ASM Annual Meeting, Atlanta, Ga.

Dieselben (1988):

Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 660-664

MURRAY, E.G.D., R.A. WEBB und M.B.R. SWANN (1926):

A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.).

J. Path. 29, 407-439

NORTHOLT, M.D., H.J. BECKERS, U. VECHT, L. TOEPOEL, P. S.S. SOENTORO und H.J. WISSELINK (1988):

Listeria monocytogenes: heat resistance and behaviour during storage of milk and whey and making of Dutch types of cheese. Neth. Milk Dairy J. 42, 207-219

OLAFSON, P. (1940):

Cornell Vet. 30, 141.

zit. n. SKOVGAARD, N. (1987):

Listeria: Major sources and routes of human infection; environment and plants.

In: *Listeriosis*; Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West) 1986, Institut f. Veterinärmedizin d. BGA, Vet. med. Hefte 5/1987, 86-97

ORTEL, S. (1971):

Ausscheidung von *Listeria monocytogenes* im Stuhl gesunder Personen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 217, 41-46

Derselbe (1975):

*Listerien*ausscheider und ihre epidemiologische Bedeutung.

Münch. Med. Wschr. 117, 1145-1148

PAPAGEORGHIU, D.K. und E.H. MARTH (1988):

Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese.

J. Dairy Sci. 71, Suppl. 1, 87

PATERSON, J.S. (1940):

The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*.
J. Path. 51, 427-436

PINI, .. und .. GILBERT (1988):

Incidence of *Listeria monocytogenes* in foods.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on
Foodborne Listeriosis, Geneva)

POMANSKAJA, .. (1961):

zit. n. SIELAFF, H. (1966):

Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose.

Mh. Vet. Med. 21, 750-758 und 792-796

RALOVICH, B., A. FORRAY, E. MERO, H. MALOVICS und I. SZAZADOS
(1971):

New selective medium for isolation of *L. monocytogenes*.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 216, 88-91

RHOADES, H.E. (1970):

Effects of 20 years storage on lyophilized cultures of bac-
teria, moldes, viruses and yeasts.

Am. J. Vet. Res. 31, 1867-1870

ROCOURT, J. (1988):

Taxonomy of the genus *Listeria*.

Infection 16, Suppl. 2, 89-91

ROCOURT, J. und P.A.D. GRIMONT (1983):

Listeria welshimeri sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 866-869

ROCOURT, J., A. SCHRETTENBRUNNER und H.P.R. SEELIGER (1983):

Différenciation biochimique des groupes génomiques de *Liste-
ria monocytogenes* (sensu lato).

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 134 A, 65-71

- ROCOURT, J., U. WEHMEYER und E. STACKEBRANDT (1987):
Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia*
gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov..
Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 266-270
- ROCOURT, J., F. GRIMONT, P.A.D. GRIMONT und H.P.R. SEELIGER
(1982):
DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes*
sensu lato.
Curr. Microbiol. 7, 383-388
- ROCOURT, J., U. WEHMEYER, P. COSSART und E. STACKEBRANDT
(1987):
Proposal to retain *Listeria murrayi* and *Listeria grayi* in the
genus *Listeria*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 298-300
- RODRIGUEZ, L.D., G.S. FERNANDEZ, J.F.F. GARAYZABAL und
E.R. FERRI (1984):
New methodology for the isolation of *Listeria* microorganisms
from heavily contaminated environments.
Appl. Environ. Microbiol. 47, 1188-1190
- ROSENOW, E.M. und E.H. MARTH (1987):
Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate
milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21
and 35°C.
J. Food Prot. 50, 452-459
- RYSER, E.T. und E.H. MARTH (1987a):
Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture
and ripening of cheddar cheese.
J. Food Prot. 50, 7-13

Dieselben (1987b):

Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese.

J. Food Prot. 50, 372-378

RYSER, E.T., E.H. MARTH und M.P. DOYLE (1985):

Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese.

J. Food. Prot. 48, 746-750 und 753

SCHLECH, W.F., P.M. LAVIGNE, R.A. BORTOLUSSI, A.C. ALLEN, E.V. HALDANE, A.J. WORT, A.W. HIGHTOWER, S.E. JOHNSON, S.H. KING, E.S. NICHOLLS und C.V. BROOME (1983):

Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food.

N. Engl. J. Med. 308, 203-206

SEELIGER, H.P.R. (1958):

Listeriose.

Barth Verlag, Leipzig

Derselbe (1961):

Listeriosis.

S. Karger-Verlag, Basel-New York

Derselbe (1981):

Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977).

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 249, 487-493

Derselbe (1984):

Modern taxonomy of the *Listeria* group. Relationship to its pathogenicity.

Clinical and Investigative Medicine 7, 217-221

SEELIGER, H.P.R. und D. JONES (1986):

Genus *Listeria* Pirie 1940, 383 ^{AL}.

In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2,
p. 1235-1245; Williams und Wilkins, Baltimore

SEELIGER, H.P.R., A. SCHRETTENBRUNNER, G. PONGRATZ und H. HOF
(1982):

Zur Sonderstellung stark hämolysierender Stämme der Gattung
Listeria.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 252, 176-190

SEELIGER, H.P.R., J. ROCOURT, A. SCHRETTENBRUNNER, P.A.D. GRIMONT und D. JONES (1984):

Listeria ivanovii sp. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 336-337

SHAHAMAT, M., A SEAMAN und M. WOODBINE (1980):

Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 246, 506-511

SIELAFF, H. (1966):

Die Lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose.

Mh. Vet. Med. 21, 750-758 und 792-796

SKOVGAARD, N. (1987):

Listeria: Major sources and routes of human infection; environment and plants.

In: Listeriosis; Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West) 1986, Institut f. Veterinärmedizin d. BGA, Vet. med. Hefte 5/1987, 86-97

SKOVGAARD, N. und C.-A. MORGEN (1988):

Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin.

Int. J. Food Microbiol. 6, 229-242

SLIVKO, V.V. (1965):

zit. nach: AMTSBERG, G. (1980): Listerien.

In: BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. II, S. 345-438.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

STEINMEYER, S. (1988):

Untersuchungen zu Pathogenität, Hitzeresistenz und Acriflavinempfindlichkeit von Listerienstämmen.

Diss. med. vet., München

STENBERG, H. (1961):

Einige Beobachtungen über die Listeriose in Finnland 1946-1960.

Zbl. Bakt. I. Orig. 182, 485-493

STUART, S.E. und H.J. WELSHIMER (1973):

Intragenetic relatedness of *Listeria pirie*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 8-14

SWAMINATHAN, B., P.S. HAYES, V.A. PRZYBYSZEWSKI und B.D. PLIKAYTIS (1988):

Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 3, 664-668

TERPLAN, G. (1988a):

Factors responsible for the contamination of food with *Listeria monocytogenes*.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva)

Derselbe (1988b):

Listerien - Vorkommen und lebensmittelhygienische Bedeutung.

Unveröffentlichter Vortrag (GDCh-Fortbildungskurs 661/88;

Weihenstephan)

Derselbe (1988c):

Persönliche Mitteilung

TERPLAN, G., R. SCHOEN, W. SPRINGMEYER, I. DEGLE und H.BECKER (1986):

Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten.

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 131-137

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION and MILK INDUSTRY FOUNDATION and INTERNATIONAL ICE CREAM ASSOCIATION (1987):

Recommended guidelines for controlling environmental contamination in dairy plants.

VAN NETTEN, P., A. VAN DE VEN, I. PERALES und D.A.A. MOSSEL (1988):

A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of *Listeria* spp. in foods.

Int. J. Food Microbiol. 6, 187-198

WATKINS, J. und K.P. SLEATH (1981):

Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water.

J. Appl. Bacteriol. 50, 1-9

WEISE, E. (1987):

Zum Vorkommen von Listerien in geschlachtetem Geflügel des Einzelhandels.

28. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 86-91

WEIS, J. und H.P.R. SEELIGER (1975):

Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature.

Appl. Microbiol. 30, 29-32

WEISSENFLUH, ..(1988):

Persönliche Mitteilung

WELSHIMER, H.J. und J. DONKER-VOET (1971):

Listeria monocytogenes in nature.

Appl. Microbiol. 21, 516-519

WELSHIMER, H.J. und A.L. MEREDITH (1971):

Listeria murrayi sp. n.: a nitrate-reducing mannitol-fermenting *Listeria*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 3-7

WIEDEMANN, M. (1988):

Kann Automation in der Käserei bakteriologische Probleme lösen?

Molkerei Ztg. "Welt der Milch" 42, 701-703

WILKINS, P.O., R. BOURGEOIS und R.G.E. MURRAY (1972):

Psychrotrophic properties of *Listeria monocytogenes*.

Can. J. Microbiol. 18, 543-551

WILSON, G.D. (1988):

Interim Guideline: Microbial control during production of ready-to-eat meat products. Controlling the incidence of *Listeria monocytogenes*.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1987):

WHO Consultation Listeriosis.

In: Listeriosis; Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control, Berlin (West) 1986, Institut f. Veterinärmedizin d. BGA, Vet. med. Hefte 5/1987

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1988):

Foodborne Listeriosis.

Unveröffentlichter Bericht (WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva)

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Direktor F. Beyer, Milchwirtschaftliche Untersuchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu), für die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie seine Bereitschaft zum fachlichen Gespräch.

Den Herren W. Springmeyer und Dr. K.H. Friedrich danke ich aufrichtig für die jederzeit gewährten Ratschläge, für die Bereitschaft zur kritischen Diskussion und die durch sie erfahrene Motivation zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Abschließend danke ich allen Mitarbeitern der Milchwirtschaftlichen Untersuchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu), die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau H. Vrabel für ihre Unterstützung bei der Ausführung der praktischen Arbeiten.

Lebenslauf

Geburtsdatum	2. Oktober 1957
Geburtsort	Simmerberg
Eltern	Ulrich Zanker und Maria Zanker, geb. Wagner
1964 - 1969	Grund- und Hauptschule/Simmerberg
1969 - 1978	Gymnasium Lindenberg/Allgäu
Juni 1978	Allgemeine Hochschulreife
1980 - 1986	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
April 1986	Approbation als Tierärztin
seit Mai 1987	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München

